12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関 国際事務局



- 1 COLLEGE CONTRACTOR CONTRACTOR CONTRACTOR CONTRACTOR CONTRACTOR CONTRACTOR CONTRACTOR CONTRACTOR CONTRACTOR

(43) 国際公開日 2003 年10 月9 日 (09.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号 WO 03/083118 A1

(51) 国際特許分類7:

C12N 15/29,

9/88, 15/60, 5/14, A01H 5/00

之 (TANAKA,Yoshiyuki) [JP/JP]; 〒305-0031 茨城県 つくば市吾妻 2-3-2-7 0 8-3 0 5 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号:

PCT/JP03/01917

(22) 国際出願日:

2003年2月21日(21.02.2003)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願2002-95721 2002年3月29日(29.03.2002) JP

- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): クミアイ化学工業株式会社 (KUMIAI CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.) [JP/JP]; 〒110-8782 東京都台東区池之端一丁目4番26号 Tokyo (JP). 独立行政法人農業生物資源研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL SCIENCES) [JP/JP]; 〒305-8602 茨城県 つくば市観音台二丁目1-2 Ibaraki (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 角康一郎 (KAKU,Koichiro) [JP/JP]; 〒437-1207 静岡県 磐田 郡福田町蛭池 276-1 サンハイツ蛭池C号 Shizuoka (JP). 清水力 (SHIMIZU,Tsutomu) [JP/JP]; 〒439-0035 静岡県 小笠郡菊川町 平尾 1 1 4 Shizuoka (JP). 河合 清 (KAWAI,Kiyoshi) [JP/JP]; 〒437-0031 静岡県 袋井市 愛野 1 5 7 0 Shizuoka (JP). 永山 孝三 (NAGAYAMA,Kozo) [JP/JP]; 〒436-0004 静岡県 掛川市八坂 2 3 8 4 4 Shizuoka (JP). 福田 篤徳 (FUKUDA,Atsunori) [JP/JP]; 〒305-0031 茨城県 つくば市吾妻 2-1 1-8 0 2-4 0 4 Ibaraki (JP). 田中喜

(74) 代理人: 平木 祐輔 , 外(HIRAKI,Yusuke et al.); 〒 105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号虎ノ門5

- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU,
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則4.17に規定する申立て:

森ビル 3階 Tokyo (JP).

すべての指定国のための不利にならない開示又は新 規性喪失の例外に関する申立て (規則4.17(v))

添付公開書類:

__ 国際調査報告書

ZA, ZM, ZW.

不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する 申立て

2文字コード及び他の略語については、定期発行される 各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語 のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: GENES ENCODING ACETOLACTATE SYNTHASE

┥(54)発明の名称: アセト乳酸シンターゼをコードする遺伝子

(57) Abstract: A high resistance on PC-based herbicides or sulfonylurea-based herbicides can be exhibited. Genes encoding the following proteins (a) or (b). (a) A protein comprising an amino acid sequence represented by any of SEQ ID NOS:2, 4, 6 and 8. (b) A protein comprising an amino acid sequence derived from an amino acid sequence represented by any of SEQ ID NOS:2, 4, 6 and 8 by substitution, deletion or addition of one or more amino acids, having a resistance against pyrimidinyl carboxy herbicides and having an acetolactate synthase activity.

(57) 要約: PC系除草剤或いはスルホニルウレア系除草剤に対して高度な抵抗性を示す。 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子である。(a)配列番号2,4,6および8のいずれか1つに配載のアミノ酸配列からなるタンパク質。(b)配列番号2,4,6および8のいずれか1つに配載のアミノ酸配列における少なくとも1以上のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、ピリミジニルカルボキシ除草剤に対する抵抗性を有し、アセト乳酸シンターゼ活性を有するタンパク質。





明 細 書

アセト乳酸シンターゼをコードする遺伝子

技術分野

本発明は、分岐鎖アミノ酸生合成経路における律速酵素であるアセト乳酸シンターゼをコードする遺伝子に関する。

背景技術

アセト乳酸シンターゼ(以下、「ALS」という。)は、ロイシン、バリン及びイソロイシン等の分岐鎖アミノ酸生合成経路における律速酵素であり、植物の成長にとって必須な酵素として知られている。ALSは、高等植物全体に渡って広く存在していることが知られており、種々の微生物、例えば酵母菌(Saccharomyces cere visiae)、大腸菌(Escherichia coli)、ネズミチフス菌(Salmonella typhimuri um)等においても見い出されている。

大腸菌及びネズミチフス菌には、ALSのイソ酵素が3種存在していることが知られている。これら各々のイソ酵素は、酵素の触媒活性を司る分子量の大きい触媒サブユニットと分岐鎖アミノ酸が結合することによりフィードバック阻害剤として機能する分子量の小さい制御サブユニットとからなるヘテロオリゴマーである(Chipman et al., Biochim. Biophys. Acta. 1385, 401-419, 1998)。触媒サブユニットは、それぞれIlv IH、Ilv GM、Ilv BNオペロンに位置している。一方、酵母菌の場合、ALSは、単一な酵素であるが、細菌と同様に触媒サブユニットと制御サブユニットとからなり(Pang et al., Biochemistry, 38, 5222-5231, 1999)、触媒蛋白質サブユニットはILV2座位に位置している。

一方、植物におけるALSの場合も、上述した微生物と同じように触媒サブユニットと制御サブユニットとからなることが知られている(Hershey et al., Plant Molecular Biology. 40, 795-806,1999)。例えば、双子葉植物のタバコの場合、ALSの触媒サブユニットは、SuRA及びSuRBの2つの遺伝子座位によってコードされ(Lee et al., EMBO J. 7, 1241-1248, 1988)、トウモロコシの場合、ALSの触媒サブ



ユニットは、als 1及びals 2の2つの遺伝子座位にコードされている(Burr et a l., Trendsin Genetics 7,55-61, 1991; Lawrence et al., Plant Mol. Biol. 1 8,1185-1187, 1992)。触媒サブユニットをコードする遺伝子に関しては、双子葉植物の場合、タバコだけでなくアラビドプシス(Arabidopsis)、ナタネ、ワタ、オナモミ(Xanthium)、アマランサス(Amaranthus)及びホウキギ(Kochia)について完全に塩基配列が決定されている(Chipman et al., Biochim. Biophys. Ac ta. 1385, 401-419,1998及び再公表特許 W097/08327参照)。単子葉植物で塩基配列が完全に決定されているのはトウモロコシとイネ(角ら、日本農薬学会第26回大会講演要旨集,101頁,2001)である。

一方、スルホニルウレア系除草剤、イミダゾリノン系除草剤、トリアゾロピリミジン系除草剤並びにピリミジニルカルボキシ系除草剤(以下、「PC系除草剤」という。)等の除草剤は、このALSを阻害することによって植物の成長を抑制することが知られている(Ray, Plant Physiol. 75, 827-831, 1984; Shaner et al., Plant Physiol. 76, 545-546, 1984; Subramanian et al., Plant Physiol. 96, 310-313, 1991; Shimizu et al., J. Pestic. Sci. 19, 59-67, 1994)。

これら除草剤に対して抵抗性を有する植物としては、表1及び表2に示すように、ALSをコードする遺伝子において、種を越えて保存されている保存領域中の1個又は2個のアミノ酸置換を引き起こす1個又は2個の塩基置換を有しているものが知られている。



表 1

ALS阻害型除草剤抵抗性を与える植物ALSの変異 (1)

植物種	変異	対象薬剤	対応するイネALSアミノ酸
Zea mays	Ala90Thr	IM	Ala96Thr
Arabidopsis thaliana	Ala122Val		Ala96Val
Xantium strumarium	Ala100Thr	IM	Ala96Thr
Beta vulgaris	Ala113Thr	IM/SU	Ala96Thr
Arabidopsis thaliana	Met124Glu		Met98Glu
Arabidopsis thaliana	Met124Ile		Met98Ile
Arabidopsis thaliana	Met124His		Met98His
Lactuca serriola	Pro→His	SU	Pro171His
Kochia scoparia	Pro189Thr	SU	Pro171Thr
Kochia scoparia	Pro189Ser	SU	Pro171Ser
Kochia scoparia	Pro189Arg	SU	Pro171Arg
Kochia scoparia	Pro189Leu	SU	Pro171Leu
Kochia scoparia	Pro189Gln	SU	Pro171Gln
Kochia scoparia	Pro189Ala	SU 😕	Pro171Ala
Brassica napus	Pro173Ser		Pro171Ser
Nicotina tabacum	Pro196Gln	รบ	Pro171Gln
Nicotina tabacum	Pro196Ala	SU	Pro171Ala
Nicotina tabacum	Pro196Ser	SU	Pro171Ser
Arabidopsis thaliana	Pro197Ser	SU	Pro171Ser
Arabidopsis thaliana	Pro197deletion	•	Pro171deletion
Beta vulgaris	Pro188Ser	IM/SU	Pro171Ser
Sisymbrium orientale	Pro→Ile		Pro171Ile
Brassica tournefortii	Pro→Ala		Pro171Ala
Scirpus juncoides	Pro→Leu	SU	Pro171Leu
Scirpus juncoides	Pro179Ala	รบ	Pro171Ala
Scirpus juncoides	Pro179Gln	SU	Pro171Gln
Scirpus juncoides	Pro179Ser	รบ	Pro171Ser
Scirpus juncoides	Pro179Lys	รบ	Pro171Lys
Lindernia micrantha	Pro→Gln	SU	Pro171Gln
Lindernia procumbens	Pro→Ser	SU	Pro171Ser
Lindernia dubia subsp.	Pro→Ser	SU	Pro171Ser
Lindernia dubia	Pro→Ala	รบ	Pro171Ala
Arabidopsis thaliana	Arg199Ala		Arg173Ala
Arabidopsis thaliana	Arg199Glu		Arg173Glu
Xantium strumarium	Ala183Val		Ala179Val
Arabidopsis thaliana	Phe206Arg		Phe180Arg

表 2

ALS阻害型除草剤抵抗性を与える植物ALSの変異(2)

植物種	変異	対象薬剤	対応するイネALSアミノ酸
Kochia scoparia	Asp260Gly	SU	Asp242Gly
Kochia scoparia	Trp487Arg	SU	Try465Arg
Kochia scoparia	Asn561Ser	SU	Asn539Ser
Kochia scoparia	Trp570Leu		Trp548Leu
Gossypium hirsutum L.	Trp563Cys	SU ?	Try548Cys
Gossypium hirsutum L.	Trp563Ser	SU ?	Try548Ser
Brassica napus	Trp557Leu		Try548Leu
Zea mays L.	Trp552Leu	IM	Try548Leu
Nicotina tabacum L.	Trp537Leu	SU ·	Try548Leu
Arabidopsis thaliana	Trp574Leu		Try548Leu
Arabidopsis thaliana	Trp574Ser		Try548Ser
Arabidopsis thaliana	Trp574deletion		Try548deletion
Xantium strumarium	Trp552Leu	IM ·	Try548Leu
Oryza sativa.	Trp548Leu	PC	Try548Leu
Amaranthus sp.	Trp569Leu		Try548Leu
Amaransus rudis	Trp569Leu	IMI	Try548Leu
Sisymbrium orientale	Trp→Leu		Try548Leu
Zea mays	Ser621Asp	IM	Ser627Asp
Zea mays	Ser621Asn	IM	Ser627Asn
Arabidopsis thaliana	Ser653Asn	IM	Ser627Asn
Arabidopsis thaliana	Ser653Thr		Ser627Thr
Arabidopsis thaliana	Ser653Phe		Ser627Phe
Arabidopsis thaliana	Ser653delition		Ser627deletion
Oryza sativa	Ser627Ile	PC	Ser627Ile
Kochia scoparia	Val276Glu	SU	

例えば、スルホニルウレア系除草剤に対して特異的な抵抗性を有するALSをコードするもの (Kathleen et al., EMBO J. 7,1241-1248, 1988; Mourad et al., P lanta, 188, 491-497, 1992; Guttieri et al., Weed Sci. 43,175-178, 1995; Bernasconi et al., J. Biol. Chem. 270, 17381-17385, 1995及び特開昭63-711 84号公報参照)、イミダゾリノン系除草剤に対して特異的な抵抗性を有するALSをコードするもの (Mourad et al., Planta, 188, 491-497, 1992; Lee et al., F EBS Lett. 452,341-345, 1999及び特開平5-227964号公報参照)、スルホニルウレア系除草剤とイミダゾリノン系除草剤の両方に対して抵抗性を有するALSをコードするもの(Kathleen et al., EMBO J. 7,1241-1248, 1988; Bernasconi et al., J. Biol. Chem. 270, 17381-17385, 1995; Hattori et al., Mol. Gen. Genet. 246,419-425, 1995; Alison et al., Plant Physiol. 111, 1353, 1996; Rajase

karau et al., Plant Sci. 119, 115-124, 1996、特開昭63-71184号公報、特開平4-311392号公報及び Bernasconi et al., US Patent 5633437, 1997参照)、或いはPC系除草剤に高度な抵抗性を有するALSをコードするもの(角ら, 日本農薬学会第26回大会講演要旨集, 101頁, 2001) が挙げられる。スルホニルウレア系除草剤に特異的に抵抗性を示すALSを有する個体とイミダゾリノン系除草剤に特異的に抵抗性を示すALSを有する個体とを掛け合わせて、両方に抵抗性を示す植物体を作る試みもなされている(Mourad et al., Mol. Gen. Genet, 243, 178-184, 1994)。さらに、ALSをコードする遺伝子を人為的に除草剤抵抗性遺伝子へ変えることも行われており (Ott et al., J. Mol. Biol. 263, 359-368, 1996、特開昭63-71184号公報、特開平5-227964号公報、特表平11-504213号公報参照)、1個のアミノ酸の欠失がスルホニルウレア系除草剤とイミダゾリノン系除草剤の両方に抵抗性を示すことが明かにされている (特開平5-227964号公報参照)。

上述のように除草剤に対する抵抗性を有するALS及びALSをコードする遺伝子について精力的に研究されてきた経緯があるが、PC系除草剤抵抗性を指標とし、PC系除草剤に対して特異的な抵抗性を有する変異ALS遺伝子については報告例が少なく、また、PC系除草剤及びその他の除草剤に対する抵抗性の検討に関しても報告例は少なかった。

発明の開示

そこで、本発明は、PC系除草剤或いはスルホニルウレア系除草剤に対して高度な抵抗性を示すALSタンパク質をコードする遺伝子、該遺伝子によりコードされるALSタンパク質、該遺伝子を有する組換えベクター、該組換えベクターを有する形質転換体、該遺伝子を有する植物、該植物の育成方法及び、該遺伝子を選択マーカーとして使用する形質転換細胞を選択する方法を提供することを目的とする。

上述した目的を達成するため、本発明者が鋭意検討した結果、野生型ALSにおける所定のアミノ酸残基を、所定のアミノ酸で置換してなる変異ALSがPC系除草剤に対して極めて高度な抵抗性を示すことを見出し本発明を完成するに至った。

(1) すなわち、本発明は、以下の(a) 又は(b) のタンパク質をコードする遺伝子である。



- (a)配列番号2, 4, 6および8のいずれか1つに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。
- (b) 配列番号2, 4, 6および8のいずれか1つに記載のアミノ酸配列における少なくとも1以上のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、ピリミジニルカルボキシ除草剤に対する抵抗性を有し、アセト乳酸シンターゼ活性を有するタンパク質。
- (2)また、本発明は、(1)記載の遺伝子によりコードされるアセト乳酸シンターゼタンパク質である。
 - (3) さらに、本発明は、(1) 記載の遺伝子を有する組換えベクターである。
- (4) さらにまた、本発明は、(3) 記載の組換えベクターを有する形質転換体である。
- (5) さらにまた、本発明は、(1) 記載の遺伝子を有し、ピリミジニルカルボキシ除草剤に対する抵抗性を有する植物である。
- (6) さらにまた、本発明は、(5) 記載の植物を、ピリミジニルカルボキシ除草剤存在下で育成することを特徴とする植物育成方法である。
- (7) さらにまた、本発明は、(1) 記載の遺伝子を選択マーカーとして使用し、 該遺伝子を有する形質転換細胞を選択する方法である。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のアセト乳酸シンターゼ遺伝子をコードする遺伝子(以下、「変異型ALS遺伝子」という)は、野生型アセト乳酸シンターゼタンパク質(以下、「野生型ALSタンパク質」という)と異なるアミノ酸配列を有するアセト乳酸シンターゼタンパク質(以下、「変異型ALSタンパク質」という)をコードするものである。変異型ALSタンパク質は、イネで発現している野生型ALSタンパク質における所定の部位を変異させることによって得ることができる。本発明の変異型ALSタンパク質は、配列番号2、4、6及び8のいずれかのアミノ酸配列を含んでいる。

配列番号2のアミノ酸配列では、野生型ALSタンパク質のアミノ酸配列における171番目のプロリンがヒスチジンに置換されるとともに、野生型ALSタンパク質のアミノ酸配列における172番目のアルギニンがセリンに置換されている。配列番号2のアミノ酸配列を含む変異型ALSタンパク質を、「P171H/R172S変異型ALSタンパ



ク質」又は「P171H/R172S変異型」と呼ぶ。

配列番号4のアミノ酸配列では、野生型ALSタンパク質のアミノ酸配列における 171番目のプロリンがヒスチジンに置換されるとともに、野生型ALSタンパク質の アミノ酸配列における548番目のトリプトファンがロイシンに置換されている。配列番号4のアミノ酸配列を含む変異型ALSタンパク質を、「P171H/W548L変異型ALS タンパク質」又は「P171H/W548L変異型」と呼ぶ。

配列番号6のアミノ酸配列では、野生型ALSタンパク質のアミノ酸配列における171番目のプロリンがヒスチジンに置換されるとともに、野生型ALSタンパク質のアミノ酸配列における627番目のセリンがイソロイシンに置換されている。配列番号6のアミノ酸配列を含む変異型ALSタンパク質を、「P171H/S627I変異型ALSタンパク質」又は「P171H/S627I変異型」と呼ぶ。

配列番号8のアミノ酸配列では、野生型ALSタンパク質のアミノ酸配列における171番目のプロリンがヒスチジンに置換されるとともに、野生型ALSタンパク質のアミノ酸配列における548番目のトリプトファンがロイシン置換されるとともに、野生型ALSタンパク質のアミノ酸配列における627番目のセリンがイソロイシンに置換されている。配列番号8のアミノ酸配列を含む変異型ALSタンパク質を、「P171H/W548L/S627I変異型ALSタンパク質」又は「P171H/W548L/S627I変異型」と呼ぶ。

図1A及び図1Bにこれら4種類の変異型ALSタンパク質のアミノ酸配列と野生型ALSタンパク質のアミノ酸配列とを比較した結果を示す。なお、図1A及び図1Bにおいて、一列目のアミノ酸配列は野生型ALSタンパク質を示しており、二列目のアミノ酸配列はP171H/R172S変異型ALSタンパク質を示しており、三列目のアミノ酸配列はP171H/W548L変異型ALSタンパク質を示しており、四列目のアミノ酸配列はP171H/S627I変異型ALSタンパク質を示しており、五列目のアミノ酸配列はP171H/S627I変異型ALSタンパク質を示しており、五列目のアミノ酸配列はP171H/W548L/S627I変異型ALSタンパク質を示している。

これら変異型ALSタンパク質は、野生型ALSタンパク質と比較して、PC系除草剤に対する優れた抵抗性を有するばかりでなく、スルホニルウレア系除草剤及びイミダゾリノン系除草剤に対しても抵抗性を有する。このことは、例えば、変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子をサブクローニングしたpGEX 2Tで形質転換した大腸菌等において、発現した変異型ALSタンパク質の除草剤感受性を調べること



により判断することができる。

ここで、PC系除草剤としては、化1に示すように、bispyribac-sodium, pyrit hiobac-sodium, pyriminobacを例示することができる。

化1

bispyribac-sodium

pyrithiobac-sodium

pyriminabac

スルホニルウレア系除草剤としては、化2に示すように、chlorsulfuronを例示することができる。

化2

chlorsulfuron

イミダゾリノン系除草剤としては、化3に示すように、imazaquinを例示することができる。

化3

imazaquin

特に、P171H/R172S変異型ALSタンパク質は、P171H或いはR172Sを単独で有する



変異型ALSタンパク質と比較して所定の除草剤に対して優れた抵抗性を示すだけでなく、P171H或いはR172Sを単独で有する変異型ALSタンパク質それぞれの抵抗性から予測される抵抗性よりも優れた抵抗性を示す。なお、R172Sを単独で有する変異型ALSタンパク質は、いかなる除草剤に対しても抵抗性を示すものではなく、R172S変異はサイレント変異である。換言すれば、P171H/R172S変異型ALSタンパク質は、単独ではサイレント変異であるR172S変異が、P171H変異型ALSタンパク質における抵抗性を向上させている。

また、P171H/W548L変異型タンパク質は、P171H或いはW548Lを単独で有する変異型ALSタンパク質と比較して所定の除草剤に対して優れた抵抗性を示すだけでなく、P171H或いはW548Lを単独で有する変異型ALSタンパク質それぞれの抵抗性から予測される抵抗性よりも優れた抵抗性を示す。換言すれば、P171H/W548L変異型タンパク質は、P171H変異型タンパク質及びW548L変異型タンパク質の両方の抵抗性から予測される相加効果の抵抗性を大幅に上回る抵抗性を示す。

さらに、特に、P171H/S627I変異型タンパク質は、P171H或いはS627Iを単独で有する変異型ALSタンパク質と比較して所定の除草剤に対して優れた抵抗性を示すだけでなく、P171H或いはS627Iを単独で有する変異型ALSタンパク質それぞれの抵抗性から予測される抵抗性よりも優れた抵抗性を示す。換言すれば、P171H/S627I変異型タンパク質は、P171H変異型タンパク質及びS627I変異型タンパク質の両方の抵抗性から予測される相加効果の抵抗性を大幅に上回る抵抗性を示す。

さらにまた、特に、P171H/W548L/S627I変異型タンパク質は、P171H、W548L或いはS627Iを単独で有する変異型ALSタンパク質と比較して所定の除草剤に対して優れた抵抗性を示す。

なお、本発明の変異型ALSタンパク質は、ピリミジニルカルボキシ除草剤に対する抵抗性を有し、且つ、アセト乳酸シンターゼ活性を有するアミノ酸配列であれば、配列番号2、4、6及び8のいずれかのアミノ酸配列において、少なくとも1以上のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなるものであってもよい。ここで、「1以上のアミノ酸」とは、1~30個のアミノ酸であることが好ましく、1個~20個のアミノ酸であることがより好ましく、1~10個のアミノ酸であることが更に好ましい。



特に、配列番号2のアミノ酸配列においては、「少なくとも1以上のアミノ酸」として171番目及び172番目のアミノ酸以外のアミノ酸であることが好ましい。配列番号4のアミノ酸配列においては、「少なくとも1以上のアミノ酸」として171番目及び548番目のアミノ酸以外のアミノ酸であることが好ましい。配列番号6のアミノ酸配列においては、「少なくとも1以上のアミノ酸」として171番目及び627番目のアミノ酸以外のアミノ酸であることが好ましい。配列番号8のアミノ酸配列においては、「少なくとも1以上のアミノ酸」として171番目、627番目及び548番目のアミノ酸以外のアミノ酸であることが好ましい。

ところで、本発明の変異型ALS遺伝子は、上述したような変異型ALSタンパク質をコードする塩基配列を有するものであれば特に限定されないが、例えば、配列番号1、3、5及び7のいずれかの塩基配列を挙げることができる。配列番号1の塩基配列は配列番号2のアミノ酸配列をコードし、配列番号3の塩基配列は配列番号4のアミノ酸配列をコードし、配列番号5の塩基配列は配列番号6のアミノ酸配列をコードし、配列番号7の塩基配列は配列番号8のアミノ酸配列をコードしている。変異型ALS遺伝子は、配列番号1、3、5及び7のいずれかの塩基配列において、所定のアミノ酸をコードするコドンを縮重コドンにより置換した塩基配列であっても良い。

図2A、図2B、図2C及び図2Dにこれら4種類の変異型ALSタンパク質をコードする塩基配列と野生型ALSタンパク質をコードする塩基配列とを比較した結果を示す。なお、図2A、図2B、図2C及び図2Dにおいて、一列目の塩基配列は野生型ALSタンパク質を示しており、二列目の塩基配列はP171H/R172S変異型ALSタンパク質を示しており、三列目の塩基配列はP171H/W548L変異型ALSタンパク質を示しており、四列目の塩基配列はP171H/S627I変異型ALSタンパク質を示しており、四列目の塩基配列はP171H/S627I変異型ALSタンパク質を示しており、五列目の塩基配列はP171H/W548L/S627I変異型ALSタンパク質を示している。

また、本発明の変異型ALS遺伝子は、配列番号1、3、5及び7のいずれかの塩 基配列に相補的な塩基配列に対して、ストリンジェントな条件下でハイブリダイ ズでき、且つ、アセト乳酸シンターゼ活性を有するアミノ酸配列をコードする塩 基配列からなるものであってもよい。ストリンジェントな条件とは、いわゆる特 異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件を



いう。ストリンジェントな条件下としては、例えば、相同性が高いDNA同士(例えば50%以上の相同性を有するDNA同士)がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件を挙げることができる。 具体的に、ストリンジェントな条件としては、通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60%、 $1\times SSC$, 0.1%SDS、好ましくは、 $0.1\times SSC$ 、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。

これら変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子は、日本型イネ品種である金南風のゲノムDNAに存在する野生型ALSタンパク質をコードする遺伝子に対して、上述したような変異を導入することによって得ることができる。変異を導入する手法としては、公知の手法を使用することができ、例えば、部位特異的変異導入法を用いることができる。部位特異的変異導入法は、市販のキット、例えばMutan-K (宝酒造株式会社製)、GeneEditor (プロメガ社製)、ExSite (ストラタジーン社製) 等を使用して行うことができる。

また、変異ALSタンパク質をコードする遺伝子は、PC系除草剤感受性の野生株培養細胞をPC系除草剤の存在下で培養し、その後、出現したPC系除草剤に対する抵抗性を示す変異株培養細胞から得ることができる。そして見い出された変異をもとにしてPCR法及びSPR(self polymerase reaction)法により、新たな変異の組み合わせを持つALSタンパク質をコードする遺伝子を、酵素を使って合成することができる。

具体的には、先ず、PC系除草剤抵抗性の変異型培養細胞からmRNAを調製し、cD NAを合成後、 λgt11ファージのcDNAライブラリーを作出する。これを、野生型AL Sタンパク質をコードする遺伝子の一部を含んでいる核酸プローブを用いてスクリーニングし、得られる陽性クローンのインサートDNAをpBluescript II SK+にサブクローニングし塩基配列を決定する。変異が認められたcDNAインサートについては、インサートDNAを保持するpBluescript II SK+を鋳型として、野性型イネA LS遺伝子を元に設計したプライマーを使い、PCR及とSPR法で変異を含む断片を合成する。一方、PC系除草剤抵抗性のイネ培養細胞からゲノムDNAを調製すると伴にイネALS遺伝子を元に各種プライマーを設計する。そしてプライマーウオーキング



によって、調製したゲノムDNAに存在するALS遺伝子のシークエンスを決定して変異部位を見つけ出す。変異が見い出された場合に、その変異を含む断片をPCR法及びSPR法で合成する。pBluescript II SK+へクローニングした変異型ALS cDNAから合成した変異を含む断片を含めて、これらの変異を含む断片をpGEX 2Tへサブクローニングし、このベクターで大腸菌を形質転換する。

その結果、配列番号 2、4、6及び8に示すアミノ酸配列をコードするインサートDNAを有するクローンを選択することによって、変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子を得ることができる。なお、上述のようにして得られた、配列番号 2に示すアミノ酸配列を含む変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子をpGEX 2T に組み込んだプラスミドはRice Mutant ALS cDNA 1(FERM BP-7944)として、配列番号 4に示すアミノ酸配列を含む変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子をpGE X 2Tに組み込んだプラスミドはRice Mutant ALS cDNA 2(FERM BP-7945)として、配列番号 6に示すアミノ酸配列を含む変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子をpGE X 2Tに組み込んだプラスミドはRice Mutant ALS cDNA 3(FERM BP-7945)として、配列番号 8に示すアミノ酸配列を含む変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子をpGEX 2Tに組み込んだプラスミドはRice Mutant ALS cDNA 3(FERM BP-7946)として、配列番号 8に示すアミノ酸配列を含む変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子をpGEX 2Tに組み込んだプラスミドはRice Mutant ALS cDNA 4(FERM BP-7947)として、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6)に、2002年3月8日付けでブタペスト条約に基づき国際寄託されている。

一方、変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子を、標的とする植物に形質転換することによって、当該植物に対してPC系除草剤等の多種の除草剤に対して抵抗性を与えることができる。植物に形質転換する手法としては、公知の手法を使用することができる。例えば、アグロバクテリウム(Agrobacterium tumefaciens)を用いて外来遺伝子を標的植物細胞に導入する手法を例示することができる。

具体的には、アグロバクテリウムのTiプラスミドのT-DNA配列を含んでいるバイナリーベクターに変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子を挿入する。このTiプラスミドを大腸菌等に形質転換する。次に、大腸菌等で増殖させた変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子を保持するバイナリーベクターを、ヘルパープラスミドを含んでいるアグロバクテリウム菌に形質転換する。そして、このアグロスミドを含んでいるアグロバクテリウム菌に形質転換する。そして、このアグロ



バクテリウム菌を、標的とする植物に感染させた後、形質転換植物を同定する。 同定された形質転換植物が培養細胞の場合には、公知の手法により、その植物細 胞を完全な植物に再生させることができる。

また、変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子を標的とする植物に形質転換する場合、公知の手法を用いて直接的に植物体に導入してもよい。さらに、変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子を有する発現ベクターを形質転換する方法としては、ポリエチレングリコール法、エレクトロポーレーション法、パーティクルガン法等を使用することができる。

一方、変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子は、単子葉植物及び双子葉植物等のいかなる種類の植物に形質転換してもよい。変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子を形質転換する対象の作物としては、例えば、イネ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、大豆、棉、アブラナ、サトウダイコン及びタバコ等を挙げることができる。さらに、変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子を導入することによって、芝草や樹木等を形質転換してもよい。

いずれの場合であっても、変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子を植物に形質転換することによって、当該植物に対して、PC系除草剤、スルホニルウレア系除草剤及びイミダゾリノン系除草剤に対する抵抗性を付与することができる。

ところで、変異型 ALS タンパク質をコードする遺伝子は、植物形質転換実験における選択性マーカーとしても使用することができる。例えば、目的遺伝子を用いて植物細胞を形質転換する場合、変異型 ALS タンパク質をコードする遺伝子と目的遺伝子とを有するベクターを植物細胞内に導入した後、当該植物細胞を PC 系除草剤等の除草剤の存在下で培養する。その結果、除草剤の存在下で生存する植物細胞には、変異型 ALS タンパク質をコードする遺伝子と共に目的遺伝子が導入されたことが判る。また、目的遺伝子及び変異型 ALS タンパク質をコードする遺伝子が植物細胞の染色体に組み込まれたかどうかは、その植物の表現型を観察した後、ゲノムサザーンハイブリダイゼーション或いは PCR によって、これら遺伝子のゲノム上の存在を調べることで確認することができる。



図1Aは、変異型ALSタンパク質のアミノ酸配列及び野生型ALSタンパク質のアミノ酸配列を比較した図である。

図1Bは、図1Aの続きであり、変異型ALSタンパク質のアミノ酸配列及び野生型ALSタンパク質のアミノ酸配列を比較した図である。

図2Aは、変異型ALS遺伝子の塩基配列及び野生型ALS遺伝子の塩基配列を比較 した図である。

図2Bは、図2Aの続きであり、変異型ALS遺伝子の塩基配列及び野生型ALS遺伝子の塩基配列を比較した図である。

図2Cは、図2Bの続きであり、変異型ALS遺伝子の塩基配列及び野生型ALS遺伝子の塩基配列を比較した図である。

図2Dは、図2Cの続きであり、変異型ALS遺伝子の塩基配列及び野生型ALS遺伝子の塩基配列を比較した図である。

図3は、Rb系統のbispyribac-sodiumに対する感受性を示す特性図である。

図4は、Sr系統のbispyribac-sodiumに対する感受性を示す特性図である。

図5は、Ga系統のbispyribac-sodiumに対する感受性を示す特性図である。

図6は、Vg系統のbispyribac-sodiumに対する感受性を示す特性図である。

図7は、野性株のbispyribac-sodiumに対する感受性を示す特性図である。

図8は、野性株のchlorsulfuronに対する感受性を示す特性図である。

図9は、Rb系統のchlorsulfuronに対する感受性を示す特性図である。

図10は、Sr系統のchlorsulfuronに対する感受性を示す特性図である。

図11は、Ga系統のchlorsulfuronに対する感受性を示す特性図である。

図12は、Vg系統のchlorsulfuronに対する感受性を示す特性図である。

図13は、抵抗性変異株のALSタンパク質の分離を目的とした陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにおけるフラクション番号とOD 525 nmの吸光度との関係を示す特性図である。

図14は、野生株のALSタンパク質の分離を目的とした陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにおけるフラクション番号とOD 525 nmの吸光度との関係を示す特性図である。

図15は、野生型ALSタンパク質及び変異型ALSタンパク質におけるbispyribac



-sodiumに対する感受性を示す特性図である。

図16は、野生型ALSタンパク質及び変異型ALSタンパク質におけるchlorsulfuronに対する感受性を示す特性図である。

図17は、野生型ALSタンパク質及び変異型ALSタンパク質におけるimazaquin に対する感受性を示す特性図である。

図18Aは、日本晴ESTの塩基配列とトウモロコシALS遺伝子の塩基配列を比較 した図である。

図18Bは、図18Aの続きであり、日本晴ESTの塩基配列とトウモロコシALS 遺伝子の塩基配列を比較した図である。

図19Aは、Sr系統由来の完全長cDNAの塩基配列と野性型cDNA1の塩基配列を 比較した図である。

図19Bは、図19Aの続きであり、Sr系統由来の完全長cDNAの塩基配列と野性型cDNA1の塩基配列を比較した図である。

図19Cは、図19Bの続きであり、Sr系統由来の完全長cDNAの塩基配列と野性型cDNA1の塩基配列を比較した図である。

図20は、G1643T(W548L)変異及びG1880T(S627I)変異をそれぞれ単独で有するALS cDNAの合成とこれを保持するpGEX 2Tの作製方法を示した図である。矢印はプライマー、アスタリスクは変異点を表す。

図 2 1 は、C512A (P171H) 変異DNA断片及びC514A (R172S) 変異DNA断片作製方法を示した図である。矢印はプライマー、アスタリスクは変異点を表す。

図 2 2 は、C512A (P171H) 変異及びC514A (R172S) 変異をそれぞれ単独で有するALS cDNAの合成とこれを保持するpGEX 2Tの作製方法を示した図である。アスタリスクは変異点を表す。

図23は、C512A(P171H)/C514A(R172S)を有するDNA断片の作製方法を示した図である。矢印はプライマー、アスタリスクは変異点を表す。

図24は、P171H/W548L変異型ALS cDNA及びP171H/S627I変異型ALS cDNAの合成とこれを保持するpGEX 2Tの作製方法を示した図である。アスタリスクは変異点を表す。

図 2 5 は、P171H/W548L/S627I変異型ALS cDNAの合成とこれを保持するpGEX 2T



の作製方法を示した図である。アスタリスクは変異点を表す。

図26は、1点変異型ALS遺伝子がコードする変異型ALSタンパク質のbispyriba c-sodiumに対する感受性を野性型ALSタンパク質と比較した図である。

図27は、2点変異型及び3点変異型ALS遺伝子がコードする変異型ALSタンパク質のbispyribac-sodiumに対する感受性を野性型と比較した図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を、実施例を用いて更に詳細に説明する。ただし、本発明の技術
節囲はこれら実施例に限定されるものではない。

[実施例1] PC除草剤抵抗性のイネ(金南風)培養細胞の作出

イネの種子(品種;金南風、学名:Oryza sativa var. Kinmaze)の籾を除いた後、当該種子を70%のエタノール中に5分間浸漬し、その後、約5%のアンチホルミン中に20分間浸漬し、その後、滅菌蒸留水で数回洗浄した。次に、この種子を表3に示す組成の培地上で静置培養した。

表 3

1 袋
1 ml
1 ml
1 ml
1 ml
2 ml
10 ml
30 g
3 g

蒸留水で 1000 ml にして、pH を 5.7 に合わせる

なお、上記培地組成中、2,4-Dは合成オーキシンである。培地を作製する際には、 先ず、上記培地組成を1リッターのビーカーに入れ、蒸留水で1000mlにす る。次に、これをpH5.7に調製し、3gのゲルライトを添加する。次に、電 子レンジを用いて加熱してゲルライトを解かした状態とし、分注機を用いて30



m 1 ずつ培養フラスコに分注する。次に、培養フラスコに3重のアルミ箔をかぶせ、オートクレーブ装置内で121℃、15~20分間加熱滅菌する。その後、室温にまで冷却することによって、上記種子を静置培養するための培地を作製した。

続いて、この培地上で誘導されたカルスから胚乳の部分を除き継代培養を行った。そして、得られたカルスの一部を、PC系除草剤の1つあるbispyribac-sodiumを 1μ M添加した液体培地(表 3 の培地組成と同様であり、ゲルライトを添加しないもの)中でおよそ2週間に1回継代しながら培養を行った。その結果、2週間 \sim 6週間程度で培養細胞が枯死し始め、約 2π 月後でほとんどが枯死して茶色に変色している培養細胞集団の中に、変色が無く細胞分裂を行っていると考えられる細胞塊が複数個得られた。これら細胞塊を単離し、培養を行った結果、 2μ Mの bispyribac-sodium存在下でも増殖する複数の細胞株を得ることができた。得られた細胞株をそれぞれRb系統、Sr系統、Ga系統及VVg系統と命名した。

その後、得られた複数の細胞株をbispyribac-sodiumの添加濃度を順次上げて培養した結果、 $100\,\mu$ Mのbispyribac-sodium共存下でも増殖できる細胞株が得られた。このbispyribac-sodium抵抗性培養細胞(以下、抵抗性変異株)を $1\sim10\,\mu$ Mのbispyribac-sodiumを添加したMS-2,4-D固体培地で継代培養した。継代培養した抵抗性変異株の一部を採取し、bispyribac-sodium無添加のMS-2,4-D液体培地に添加して、8日~10日間のサイクルで懸濁培養した。

そして、この抵抗性変異株約1.5 g(湿重量)を、MS-2,4-D液体培地50 mlと所定の濃度のbispyribac-sodiumとを入れておいた200mlの三角フラスコに移植し、約27℃で所定期間培養した。経時的にカルスの湿重量を測定し、移植した抵抗性変異株の湿重量を基準にして相対的な増殖量を求めた。なお、試験は、bispyribac-sodium濃度を変化させたものを3連で行い、標準誤差(standard error)を算出した。抵抗性変異株におけるbispyribac-sodium濃度変化と8或いは12日目の相対重量との関係を図3~6に示す。また対照として、金南風の野生株を用いて同様な実験を行い、bispyribac-sodium濃度と8日目の相対重量との関係を測定した結果を図7に示す。

図7から判るように、野生株では、1 nMのbispyribac-sodium添加区で増殖阻害



されなかったが、 $10 \text{ nM以上のbispyribac-sodium添加区で増殖阻害されていることが判る。一方、図3~6から判るように、抵抗性変異株(<math>Rb$ 系統、Sr系統、Ga 系統及びVg系統)では、Vg系統以外は 10μ Mのbispyribac-sodium添加区においてもほとんど増殖に影響を受けていないことが判る。Vg系統であっても、野生株と比較すると、Dispyribac-sodiumの増殖に対する影響が小さいことが判る。

一方、bispyribac-sodiumに代えてchlorsulfuronを用いた場合も、上述したように野生株及び抵抗性変異株の増殖率を測定した。野生株におけるchlorsulfuron濃度変化と9日目の相対重量との関係を図8に示す。また、抵抗性変異株、すなわち、Rb系統、Sr系統、Ga系統及びVg系統におけるchlorsulfuron濃度変化と8或いは10日目の相対重量との関係を図9~12に示す。

図8から判るように、野性株では、1 nMのchlorsulfuron添加で増殖阻害を受けており、bispyribac-sodiumの場合よりも高い感受性を示した。一方、図9~12から判るように、Rb系統、Sr系統、Ga系統及VVg系統では、それぞれ感受性は異なるが、CChlorsulfuron添加による増殖阻害の影響が小さく、CChlorsulfuronに対する抵抗性を示した。なお、CDispyribac-sodium及VCchlorsulfuronに対する感受性は、野性株及び抵抗性変異株において、培養時間が長くても共に大きく変化することはなかった。また、増殖速度は、抵抗性変異株及び野性株において、ともにほぼ同じであった。

これらの結果から、抵抗性変異株は、bispyribac-sodiumに対して高い抵抗性を 有するものであることが明らかとなった。また、抵抗性変異株は、野生株と比較 してchlorsulfuronに対する抵抗性が向上していることも明らかとなった。

〔実施例2〕抵抗性変異株から部分精製したALSタンパク質の薬剤感受性

本例では、実施例1で得られた抵抗性変異株(Ga系統を除く、Rb系統、Sr系統 及びVg系統)から変異型ALSタンパク質を部分精製し、得られた変異型ALSタンパク質における薬剤感受性を検討した。変異型ALSタンパク質は以下のようにして部 分精製した。

先ず、表3のうちゲルライトを除いた組成で液体培養法 (bispyribac-sodium 無添加) により抵抗性変異株を200 g以上調製した。次に、これらの約150 gを組



織重量の3倍量の緩衝液-1 (20 %(v/v)のグリセロール、0.5 mMのチアミンピロリン酸 (TPP)、 $10 \mu \text{M}$ のフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD)、0.5 mMの MgCl_2 、組織重量の1/10量のポリビニルポリピロリドンを含む100 mMのリン酸カリウム緩衝液pH 7.5) でヒスコトロンを用いてホモジナイズした。ホモジネートをナイロンガーゼでろ過した後、 $15000 \times \text{g}$ で20分間遠心した。遠心上澄に、50 %飽和となるように硫酸アンモニウムを添加し、氷中に約1時間放置した。これを再度、 $15000 \times \text{g}$ で20分間遠心し、その沈澱画分を約30 m1の緩衝液-2 (20 %(v/v))のグリセロール、0.5 mMの1PP、0.5 mMの1BGCl2を含む10 mMのトリス塩酸緩衝液緩衝液1PH 7.5) に溶解した。これを再度、 $15000 \times \text{g}$ で10 mM0トリス塩酸緩衝液緩衝液10 mM0トリス塩酸緩衝液緩衝液10 mM1 に溶解した。これを再度、 $15000 \times \text{g}$ 0の分間遠心し、その上澄画分をセファデックス10 mM1 にアプライして素通り画分を約10 mM1 にアプライして素通り画分を約10 mM2 にアプライして素通り画分を約10 mM3 にアプライして素通り画分を約10 mM4 にアプライして素通り画分を約

次に、粗酵素液のタンパク質の濃度を、Bio-Rad Protein Assayのマニュアルに従ってBradford法で測定した。その後、粗酵素液をワットマンフィルター(ワットマン社製)でろ過し、タンパク質量として適正な量の粗酵素液(10~15 ml)をFPLC装置(アマシャム バイオサイエンス社製)を使用して、3本連結したHiTrapQ(アマシャム バイオサイエンス社製)にアプライした。HiTrapQを用いてタンパク質成分を吸着させた後、ベッドボリュームの3~5倍量の緩衝液-2で非吸着面分を流し出した。その後、吸着したタンパク質成分を、ベッドボリュームの10倍量(150 ml)の溶出液を用いて溶出した。ここで、溶出液は、0~0.4 Mの直線濃度勾配で緩衝液-2にKC1を溶解させたものである。タンパク質成分を溶出した溶出液は、複数の分取用試験管に5 mlずつ分取した。なお、溶出したタンパク質成分に含まれるALSタンパク質を安定化するために、20 mMのピルビン酸ナトリウムを含む緩衝液-2 (0.5 ml) を事前に分取用試験管の中へ添加しておいた。

次に、複数の分取用試験管に分取された溶出画分に含まれる変異型ALSタンパク質に由来するALS活性を、以下のように測定した。測定反応に使用する反応溶液は、20 mMのピルビン酸ナトリウム、0.5 mMのTPP、0.5 mMのMgCl₂、 10μ MのFAD及び20 mMのリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) からなる溶液に、測定対象の溶出画分を混合したものである。この反応溶液を1 ml使用した。測定反応は、測定対象の溶出 画分を添加した後、30℃で40分~60分間行った。また、測定反応は、0.1 mlの6



N硫酸 (あるいは0.25 Nの水酸化ナトリウム)を添加することにより停止させた。 次に、反応が終了した反応溶液を60℃で10分間インキュベートした。これによ り、反応溶液中に含まれるアセト乳酸をアセトインに変化させた。

次に、反応溶液中に含まれるアセトインを定量するため、0.5%(w/v)のクレアチン1 mlと2.5 Nの水酸化ナトリウムに溶かした5%(w/v)の α -ナフトール1 mlとを添加し、37^{\circ}でで10分間インキュベートした。その後、反応溶液における吸光度525 nmを比色することでアセトインを定量し、ALS活性を評価した。なお、反応溶液中には、少量のピルビン酸ナトリウムが含まれるため、反応0時間をコントロールとした。

その結果、OD525 nmにおける吸光度が反応溶液O.2 ml当たりで約7という高い値となった。しかしながら、上述した測定反応を水酸化ナトリウムで停止させ、ALS活性以外によるアセトイン生成活性を調べた結果、この見掛け上のALS活性の80%近くが変異型ALSタンパク質以外の直接的なアセトイン生成活性であることが判った。そこで、変異型ALSタンパク質と変異型ALSタンパク質以外のアセトイン生成活性を、陰イオン交換樹脂を使用したFPLCで分離した。抵抗性変異株としてSr系統を用いた場合の結果を図13に示す。図13に示すように、3つの活性ピークが検出された。

これら3つの活性ピークのうち、どちらに変異型ALSタンパク質が含まれているのを判定するために、各ピークのアセトイン生成活性を調べた。その結果、変異型ALSタンパク質は、初めに溶出したピークで示される画分に含まれていることがわかった。

そして、変異型ALSタンパク質を含む酵素溶液を用いて、当該変異型ALSタンパク質のbispyribac-sodium、chlorsulfuron及びimazaquinに対する感受性を調べた。各除草剤に対する感受性は、酵素溶液を添加する前に除草剤を所定の濃度となるように反応液中に添加した以外は、上述した測定反応と同様にしてALS活性を測定することによって評価した。また、比較のために、野生型ALSタンパク質を同様にして分離精製し(図14)、実験に供した。なお、bispyribac-sodiumは水溶液とし、chlorsulfuron及びimazaquinはアセトン溶液とした。アセトン溶液は最終濃度1%とした。



ALS活性阻害率とbispyribac-sodium濃度との関係を図15に示す。ALS活性阻害率とchlorsulfuron濃度との関係を図16に示す。ALS活性阻害率とimazaquin濃度との関係を図17に示す。なお、これら図15~図17において、野生型ALSタンパク質を破線で示し、Sr系統の変異型ALSタンパク質は二点破線で示し、Rb系統の変異型ALSタンパク質は実線で示し、Vg系統の変異型ALSタンパク質は一点破線で示している。

また、上述した実験から、ALS活性を50%阻害する除草剤濃度(I50値)をプロビット法に準じて算出し、変異ALSタンパク質におけるI50値と野生型ALSタンパク質におけるI50値との比を算出した。結果を表4に示す。

表 4

	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	I ₅₀ (nM))	
化合物 -	野生型	Vg	Sr	Rb
Bispyribac-sodium	5.63	97.2	421	247000
Chlorsulfuron	17.3	495	92.8	32000
Imazaquin	1480	44100	16700	609000

さらに、表4の結果から、各除草剤について抵抗性変異株のI50値を野生株のI 50値で除算し、RS値を算出した結果を表5に示す。

表 5

	RS 比			
化合物 —	Vg	Sr	Rb	
Bispyribac-sodium	17.3	74.80	43900	
Chlorsulfuron	28.6	5.36	1850	
Imazaquin	29.8	11.30	411	

これら図15~図17、表4及び表5に示すように、変異型ALSタンパク質は、 野生型ALSタンパク質と比較して除草剤存在下でも比較的高いALS活性を示した。 特に、Rb系統及びSr系統由来の変異型ALSタンパク質では、それぞれbispyribacsodiumに対する感受性が他の除草剤に対する感受性と比較して顕著に優れている



ことが判った。すなわち、これらRb系統及びSr系統は、特にbispyribac-sodium に対する抵抗性に優れたものであることが判った。

[実施例3] 野生型及び変異型ALS遺伝子のクローニング

本例では、野生株から野生型ALSタンパク質をコードする遺伝子(野生型ALS遺伝子)をクローニングするとともに、抵抗性変異株から変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子(変異型ALS遺伝子)をクローニングした。

野生型ALS遺伝子及び変異型ALS遺伝子をクローニングする際に使用するプローブを以下のようにして調製した。本例においてプローブとしては、トウモロコシのALS遺伝子と高い相同性を示したイネ(日本晴)由来部分cDNAを使用した。

(1)トウモロコシのALS遺伝子と高い相同性を示したイネ(日本晴)由来部分cDNA の塩基配列の決定

社団法人農林水産先端技術産業振興センター及び独立行政法人農業生物資源研究所が行っているイネゲノムプロジェクトの一環でイネ (日本晴)のcDNAの部分塩基配列の決定が行われており、cDNAの部分塩基配列データベースが構築されている。このデータベースに含まれる約350 bpの塩基配列として既に知られているcDNAクローン (アクセッション番号: C72411)がトウモロコシにおけるALS遺伝子と高い相同性を示した。なお、トウモロコシにおけるALS遺伝子は完全に塩基配列が決定されている。

そして、このcDNAクローン(アクセッション番号: C72411)を農業生物資源研究所から入手し、以下のように塩基配列を決定した。なお、このcDNAクローンは、ALSホモログ遺伝子がpBluescript II SK+中に挿入されており、大腸菌内で自律複製を行うことができる形であった。

先ず、このALSホモログ保持プラスミドベクターを大腸菌(DH5α)へ形質転換した。プレートより得られた白色のコロニーを液体培養し、菌体より常法に従いプラスミドを抽出した。インサートDNAはプラスミドベクター中のマルチクローニングサイトの制限酵素、Sal IとNot Iの間に挿入されていたのでこの2つの酵素でベクターを消化し、アガロース電気泳動でインサートの確認を行った。この後、得られたALSホモログ保持プラスミドベクターをRNaseA、PEG、LiCl等を使用する



常法に従って精製し、プライマー及びABI BigDyeTerminator Cycle Sequencing kitを用いシークエンス反応を行った。PCRの条件はプロトコールに従った。またプライマーはM13プライマー及び決定した塩基配列から設計した合成プライマーを用いた。得られたPCR産物をエタノール沈殿で精製し、ABI PRISM 310シークエンサーで塩基配列を決定した。

このALSホモログ保持プラスミドベクターには、1.6 kbpのインサートDNAが入っているという情報であった。得られたALSホモログ保持プラスミドベクターをSal IとNotIの制限酵素で消化し、電気泳動を行ったところ、pBluescript II SK+に相当する約3 kbpのバンドとインサートDNA断片に相当する1.6 kbpのバンドが検出された(図示せず)。インサートDNA部分についての全塩基配列を決定し、トウモロコシの塩基配列の相同性検索を行った結果、図18A及び図18Bに示すように、84.7%の相同性を示した。したがって、このALSホモログは日本晴におけるALS遺伝子の部分cDNAであると判断されたので、Sal I及びNot Iで消化して切り出したインサートDNAをプローブとした。なお、図18A及び図18Bにおいて、一列目は日本晴におけるALS遺伝子のcDNAの塩基配列であり、二列目はトウモロコシにおけるALS遺伝子の塩基配列である。

(2) 抵抗性変異株及び野性株からのmRNAの調製

先ず、液体窒素で凍結した抵抗性変異株を、乳鉢と乳棒を用いて摩砕した後、ミキサーにより30秒間細かく粉砕した。粉砕後の粉末を抽出緩衝液〔(100 mM Tr is-HCl pH 9.0, 100 mM NaCl, 1重量% SDS, 5 mM EDTA): (β -mercaptoethano l): (Tris飽和フェノール) =15:3:20〕中に懸濁し,その後よく撹拌した。この溶液を12000×gで15分間遠心し上澄を回収し、200 mlのPCI〔(Tris飽和フェノール): (chloroform): (isoamylalcohol) =25:24:1〕を加え、4℃で10分間振とうした後、12000×gで15分間遠心し上澄を回収した。この操作を2回繰り返した。 得られた上澄に1/20量の5 MのNaCl、2.2倍量のエタノールを加え、-80℃で30分間静置した後、12000×gで5分間遠心することで沈殿を回収した。沈殿を70 %エタノールで洗浄し、乾燥させた後に10 mMの β -メルカプトエタノール溶液に溶かし、この溶液を27000×gで10分間遠心して不溶性画分を除いた後、10 MのLiClを1/4



量加えて氷上で1時間静置した。これをさらに27000×gで10分間遠心して沈殿を回収し、4 mlの H_2 0に溶かした後、260 nmの吸光度を測定してRNAの濃度を求めた。これに1/20量の5 M NaClと2.2倍量のエタノールを加えて、-80℃で30分間静置した後、 $27000 \times g$ で10分間遠心して沈殿を回収し、70 %エタノールで洗浄後乾燥させた。これを適量の H_2 0に溶かしトータルRNA溶液とした。なお、遠心操作は4℃で行った。

このトータルRNAから次の方法でmRNAの分離精製した。抽出したトータルRNA溶液の液量に対して等量の2×結合バッファー(20 mM Tris-HC1(pH 7.5), 10mM ED TA, 1 M NaC1)を加えた。0.1 gのoligo dT cellulose(アマシャム バイオサイエンス社製)を詰めたカラムを1×結合バッファーで洗浄した後、このトータルRNA溶液をカラムにかけた。1×結合バッファーで洗浄した後、溶出バッファー(10 mM Tris-HC1(pH 7.5), 5 mM EDTA)をアプライし、溶出液を0.5 mlずつ回収した。なお、カラムを素通りした画分については、別のoligo dT cellulose(アマシャム バイオサイエンス社製)カラムにかけ、同様の操作を行った。各画分の吸光度から溶出されたmRNAの濃度を計算した後、1/10量の10 M LiC1と2.5倍量のエタノールを加えて-80℃で30分間静置した。これを遠心して沈澱画分を乾燥した後100 $\mu1$ の10 M LiC1と10 で 10 M LiC1と10 で 10 M LiC1と10 で 10 M LiC1と10 の 10 M LiC1と10 M LiC1と1

分離精製したmRNAを、25 % ショ糖溶液及び5 % ショ糖溶液を用いて密度勾配をつけた遠心管にアプライし、スウィングローターを用いて4℃、27000 rpmで15時間超遠心を行った。遠心後、密度勾配の順に各0.5 mlずつ分画回収した。それぞれの画分の吸光度を測定し、回収されたmRNAの濃度を計算するとともにECLキット(ECL direct nucleic acid labelling and detection system, アマシャム バイオサイエンス社製)によるハイブリダイゼーションによりALS mRNAの存在を確認した。ハイブリダイゼーションは、上記(1)で調製したプローブを用いて42℃で16時間行った。また、ハイブリダイゼーション後の洗浄は、キット添付の1次洗浄バッファーを用いて42℃で5分間を2回、その後、2×SSC溶液を用いて42℃で5分間を1回行った。洗浄後の膜は、透明のプラスティックフィルムで包みキット付属の発光試薬に浸し多状態を維持し、その後、X線フィルムに感光させた。



これらの操作により、抵抗性変異株としてSr系統を用いた場合には、約35 mg のトータルRNAを抽出するとともに、約4 mgのmRNAを抽出することができた。また、ショ糖密度勾配遠心法では、予想される画分にハイブリダイゼーション陽性のスポットが認められた。

一方、野生株を用いたところ、約95mgのトータルRNAを抽出するとともに、約7mgのmRNAを抽出することができた。野生株からmRNAを抽出する際には、抵抗性変異株に代えて野生株を使用した以外は、上述した方法を適用した。

(3) 抵抗性変異株及び野性株由来のcDNAライブラリの作製

上記(2)で精製した $mRNA2 \mu$ g及びcDNA合成キット(アマシャム バイオサイエンス社製)を用いてcDNAの合成を行い、抵抗性変異株由来のcDNAライブラリの作製した。

先ず、逆転写反応にはキット添付のRTaseを使用し、その後の相補鎖伸長反応にはキットに添付のT4 DNApolymeraseを使用した。相補鎖伸長反応の際には、cDNA合成の収率を計算するために 32 P-dCTPを加えた。合成したcDNAは、アダプターを付加した後、in vitroパッケージング法により λ ファージへ組み込んだ。

cDNAに付加するアダプターとしては、宝酒造株式会社製のEco RI-Not I-Bam H Iアダプターを使用した。cDNAを含む溶液にcDNAに対してモル濃度で50倍のアダプターを加え、この混合溶液にT4 DNA Ligase (ファルマシア社製)を加えてライゲーション反応を4℃で一晩行った。この反応溶液をAsahiPak GS 710カラム(旭化成工業株式会社製)を用いてHPCLにアプライし、溶出液を波長260 nmの紫外線でモニターした。溶出液を0.5 ml程度ずつ25本に分画し、各フラクションをCerenkovカウンターで測定し、カウントの高いフラクションを3~4本回収した。このフラクションをT4 polynucleotide kinase (宝酒造株式会社社製)を用いてアダプターの5'末端をリン酸化した後、 λ gt 11 Eco RIアームを加えてライゲーションした。ライゲーション反応は、溶液にGigaPack Gold III (Stratagene社製)を加えて室温で2時間行った。反応終了後、200 μ 1のSMバッファーと8 μ 1のクロロホルムを加えてファージ溶液とした。このファージ溶液を10倍希釈し、これの1 μ 1を大腸菌 (Y-1088) に感染させた後、0.7% トップアガーを加え、LBプレートに蒔



き、4時間から8時間後にプレートに現れたプラークの数を数えることでタイター を測定した。

DE 81ペーパーとCerenkovカウンティングの結果からSr系統由来のcDNAが約74 ng合成されたことが判った。アダプターを付加したベクターのライゲーション後のCerenkovカウンティングの結果からSr系統について約22 ngのインサートが挿入された λ DNAが得られた。この λ DNAをファージへパッケージングし、これを抵抗性変異株細胞由来のcDNAライブラリとした。このライブラリ溶液のタイターは、16600pfu/ μ 1であった。

一方、野生株から抽出したmRNAを用いて、上述した方法に準じてcDNAライブラリを調製したところ、野生株由来のcDNAが約38 ng合成されたことが判った。また、野生株についてインサートが挿入された λ DNAが約5 ng得られた。さらに、野生株由来のcDNAライブラリ溶液のタイターは18160 pfu/μ1であった。

(4) ALS遺伝子を含むcDNAのスクリーニング

プレートに20000個程度のプラークが出るように、上記(3)で調製したライブラリ溶液を希釈した後、野性株由来及びSr系統由来のファージをそれぞれ10枚ずつ蒔いた。プラークをニトロセルロースメンブレン(Schleicher & Schnell社製、PROTORAN BA85、ポアサイズ $0.45\,\mu$ m)へ転写し、転写したニトロセルロースメンブレンを変性溶液($0.5\,M$ NaOH、 $1.5\,M$ NaCl)、続いて中和溶液($1.5\,M$ NaCl, $0.5\,M$ Tris-HCl(pH7.5)、 $1\,m$ EDTA)に約20秒浸した。濾紙を用いてニトロセルロースメンブレンから余分な水分を除去した後、ニトロセルロースメンブレンを80℃で2時間ベーキングした。なお、ニトロセルロースメンブレンに代えてHybondーN+(アマシャム バイオテック社製)を用いた際には、ベーキング操作は省略し、 $0.4\,M$ NaOHにて20分間固定した。

上記(1)で調製したインサートDNAを、RI及び非RIの2種類の方法でラベル化しプローブDNAとして使用した。RIラベル化とハイブリダイゼーションは次の方法で行った。まず、約200~500 ngのプローブDNAを熱変性させた。BcaBEST DNA labelling kit (宝酒造株式会社製)を用いてラベルを行った。このラベル化反応に際して、キットに添付のバッファー、ランダムプライマー及び 32 P-dCTPを加えた。



BcaBESTを加え、65℃で30分間インキュベートした。その後、EDTAを加えて反応を停止させた。ニトロセルロースメンブレン8枚程度にプローブがおよそ100 ng程度含まれる容量を加え、42℃、一晩、微振とうでハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、2×SSC, 0.1% SDS溶液で3回洗浄し後、BAS 2000イメージングアナライザー(富士フィルム株式会社製)のイメージングプレートに約1時間露光させた。露光後イメージングアナライザーを用いて陽性クローンを検出した。

一方、非RIラベル化は次の方法で行った。約200~500 ngのプローブDNAを熱変性させた後、ECLダイレクトDNA/RNAラベリング・検出システム(アマシャム バイオサイエンス社製)添付のDNA標識試薬(ペルオキシダーゼ)及びグルタルアルデヒドを加えて37℃でインキュベートした。この場合、ニトロセルロースメンブレン膜8枚程度におよそ100 ng程度のラベル化プローブDNAが含まれるように添加した後、42℃、一晩、微振とうでハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション終了後、primary washing bufferを室温、10分間、3回、その後2×SS Cで室温、10分間、1回で膜の洗浄を行った。膜をECLキット添付の発光液に浸し、30分から3時間でX線フィルムに露光した。

ハイブリダイゼーション (1次スクリーニング) の結果得られた陽性ファージを滅菌した爪楊枝でトップアガーごと掻き取り、200 μ 1のSMバッファーに懸濁し、ファージ溶液を得た。このファージ溶液を各クローンごと適宜希釈を行い、大腸菌Y-1088株に感染させ、LBプレートに蒔いた。この新たに作製したプレートを用いて、同様にハイブリダイゼーション (2次スクリーニング) を行い、陽性ファージを200 μ 1のSMバッファーに懸濁し、シングルファージとした。なお、2次スクリーニングでシングルファージとして単離できなかった場合、もう一度希釈してLBプレートに蒔き、ハイブリダイゼーション (3次スクリーニング) を行ってシングルファージにした。

このシングルファージから次の方法で λ DNAを調製した。竹串又は爪楊枝を使って陽性クローンのプラークから集めた λ ファージを、新鮮な宿主大腸菌(Y1088) 懸濁液を $5~\mu$ 1含む200 μ 1の2xYT培地(10 mM MgCl $_2$ と0.2~%マルトースを含む) にイノキュレートした。静置状態42℃で一晩インキュベートした後、再度宿主大



腸菌 (Y1088) 懸濁液を25 μ1含む1 mlの2xYT培地 (10 mM MgCl₂と0.2 %マルトー スを含む) にイノキュレートし一晩振とう培養した(以上が前培養)。前培養した 溶液 (10~50 μ1) を10 mMのMgCl2と0.5 mlの大腸菌Y1088懸濁液とを含む12 ml の2xYT培地にイノキュレートし、比較的強く振とうしながら溶菌後濁度が増すま で42℃で一晩インキュベートした。培養終了後、50 µ1のクロロホルムと1.2 ml の5 M NaClを加え、振とうしながら42℃で10分間インキュベートした。これを27 000×gで10分間遠心した後、新たに遠心管に移した上澄に5 mlの50 % PEGを加え、 氷上で1時間以上インキュベートした。これを27000×gで10分間遠心し上澄を捨て た後、再度27000×gで遠心して液体部分を捨てた。沈澱画分を4μgのDNase I、2 0μgのRNase Aならびに10 mMのMgCl₂を含む30mMのトリス塩酸緩衝液pH7.5の300 µ1に懸濁させ、1.5 mlチューブへ移した。この懸濁液を37℃で30分間インキュベ ートした後、7.5 μ 1の20%SDS、3 μ 1のproteinase K (10 mg/ml)、12 μ 1の0.5 M EDTAを加え、さらに55℃で15分間インキュベートした。これに150μ1のフェノー ルを加えて激しく撹拌した後、トミーマイクロ遠心機MR-150 (トミー精工社製) を用いて15000 rpmで3分間遠心し、水層を回収した。集めた水層に $800 \, \mu\, 1$ のエチ ルエーテル (蒸留水を加えて過酸化物を除いておく)を加え激しく撹拌した後、1 5000 rpmで10秒間遠心しエーテル層を捨てた。このエーテル抽出操作を繰り返し た後、水層に残存するエーテルを窒素ガスで除去した。水層に30μlの5 M NaCl、 875 μ 1のエタノールを加えることで沈澱してきた λ DNAを速やかに回収し、 λ DNA を1 ml程度の70 %エタノールでリンスした後、約1分間減圧下で乾燥させてエタノ ールを除いた。これを $20\mu1$ ~ $50\mu1$ のTE 緩衝液(pH 8.0)に溶かして λ DNA溶液 とした。

得られた λ DNA中のインサートDNAのサブクローニング及び塩基配列決定は次の方法で行った。得られた λ DNA溶液(1μ 1)をNot Iで消化し、インサートDNAを切り出した。切り出し反応の反応液組成は制限酵素添付の説明書に従い、 37° で約2時間反応させた後、1%アガロースゲルを使用した電気泳動でインサートサイズの確認を行った。インサートDNAを持つ λ DNA(10μ 1~ 20μ 1)をNot Iで消化し、インサートDNAを切り出した。これを分取用のアガロースゲルで分離した後、相当するバンドをゲルから切り出し、常法によりインサートDNAを精製した。このイン



サートDNAとBAP処理(エビのアルカリフォスファターゼを用いた脱リン酸化処理)したベクターとをモル比で1:1の割合で混合し、T4 DNAリガーゼで16℃、2時間以上ライゲーション反応を行った。なお、インサートDNAはNot Iで切り出したものを材料としたので、BAP処理についてもNot Iで切断したベクターについて行った。ライゲーション終了後、その溶液の一部をコンピテントセル(DH5 α)と混合し、氷上に30分間放置した。これを42℃で30秒間ヒートショックを行い、さらに氷上に2分間放置した。続いてSOCを添加し37℃で1時間インキュベートした後、2×YT(50μg/mlのアンピシリン入り)の100μ及び3% X-Gal 30μlならびに1 M IPTG 3μlを混合したものを事前に均一になるようにまいておいたLB培地上プレートにまき、37℃で10時間以上培養した。形質転換された白色コロニーをアンピシリン入りのLB培地あるいは2xYT培地の2 mlに1つのコロニーを接種した後37℃で一晩培養した。この培養液から常法によりプラスミドを調製しH20に溶かしDNA濃度を定量した後シークエンス用PCR反応に供した。PCR反応及び塩基配列決定は上述した方法で行った。

以上の実験により、野性型及びSr系統のそれぞれの培養細胞から約2.2 kbの不完全長のALS cDNAが得られた。このDNAの5'側から約250 bpの位置にSma Iサイトが存在したので、さらに次の方法で新たなプローブを作製した。野生株由来の約2.2 kbpの不完全長のALS cDNAを保持するpBluescript II SK+を宿主大腸菌のJM109で増やした後、プラスミドを自動分離装置(KURABO PI-100)で抽出した。このプラスミドを直接Sma Iで消化し、生成した約250 bp の断片を1 %のアガロース電気泳動で分離精製し濃度を算出後プローブとした。このプローブを用いて上述のRIを使用した方法で再度ライブラリをスクリーニングした。その結果得られたシングファージから 2 DNAを調製し、その 2 DNA容液(1μ1)をEco RIで消化し、電気泳動でサイズを確認した後、ニトロセルロースメンブランに固定した。電気泳動後のゲルを1.5 M NaClを含む0.5 M NaOH 溶液中に浸し15分間程度軽く振とうした。この後ゲルを水洗し、3 MのNaClを含む0.5 M Tris-HC1(pH7.5)に浸し15分程度振とうしながらゲルを中和した。ステンレスバットに20×SSCを張り、その中に工業用の厚手のろ紙を5枚程度重ねた台座を置いた。その上に中和後のゲル、メンブラン(所定の大きさに切断したニトロセルロースメンブランを蒸留水になじま



せた後、20×SSCでさらに10分間なじませた)、2枚重ねのろ紙を順番に乗せた後、さらにその上に3cm~4cm厚のペーパータオルを重ねた。この上にガラス板を乗せ、その上に軽い重しを乗せた後、約5分間ブロッティングを行った。この後、ゲルとメンブランの間に気泡が入っていないことを確かめた上で10分間程度ブロッティングを行った。ブロッティング終了後、メンブランをトランスイルミネーターでUV処理し、15分から30分程度80℃でベーキングした。ベーキング終了後、3²Pでラベルした上述の250 bpプローブDNAによるハイブリダイゼーション(ハイブリダイゼーション緩衝液組成:5×SSPE,0.5% SDS,5×Denharlts,solum sperm DNA,50 %formamide)を行い、結合したバンドの放射能をイメージングプレートへ写し取り、BAS-2000でその結果を解析した。このハイブリダイゼーションで陽性を示したインサートの中で比較的大きなサイズを示したものを大量に調製し、上述した方法でEco RI消化後BAP処理したpBluescript IISK+にサブクローニングした。これを大腸菌(JM 105)に形質転換し、得られた形質転換体を液体培養後、常法によりプラスミドを調製し、上述の方法で塩基配列を決定した。

その結果、野性型及びSr系統のそれぞれの培養細胞からALS完全長 cDNAを取得することができた。これらの野生型と変異型ALS遺伝子相同性を比較した結果を図19A、図19B及び図19Cに示すように、Sr系統では、野性型と比較して、転写開始コドンATGの最初の塩基Aを起点として1643番目及び1880番目の2点の変異が認められた。Sr系統では、野生型における1643番目のGがTに変異(G1643Tと表記する)し、野生型における1880番目のGがTに変異(G1880Tと表記する)していた。これらの変異はアミノ酸に変換すると、Sr系統の変異型ALSタンパク質は、野生型ALSタンパク質における548番目のトリプトファンがロイシンへ変異(すなわち「W548L変異」)し、野生型ALSタンパク質における627番目のセリンがイソロシンへ変異(すなわち「S627I変異」)したアミノ酸配列を有することを意味していた。

(5) pBluescript II SK+ヘクローニングした野性型 ALS cDNAの pGEX 2Tへのサブクローニング

上記(4)で得られた野性型 ALS 完全長 cDNA を組み込んだ pBluescript II SK - 30 -



+プラスミドを Eco RI で消化して、野性型 ALS 遺伝子を含む cDNA を切り出した後、大腸菌発現ベクターである pGEX-2T(アマシャムバイオサイエンス社製)の Eco RI サイトに組み込んだ。以下、pGEX-2T における Eco RI サイトに野性型 ALS 完全長 cDNA を組み込んだ発現ベクターを、「pGEX-2T (ALS-wild)」と呼ぶ。pGEX-2T (ALS-wild)を大腸菌(JM 109)に形質転換し、形質転換により得られたコロニーを液体培養してプラスミドを抽出し、シークエンスによりインサート DNA の挿入方向を確認した。これにより pGEX-2T (ALS-wild) で形質転換した大腸菌(JM109)を作製した。

[実施例4] PC除草剤抵抗性イネ培養細胞ALS遺伝子の変異部位の解明

(1) 抵抗性変異株(Sr, Rb, Vg, Ga系統株)からのゲノムDNAの抽出

植物DNA抽出キットISOPLANT II (ニッポンジーン社)を用い、添付のプロトコルに従って、Sr、Rb、Vg及びGa系統のぞれぞれの培養細胞0.1 gからゲノムDNAを抽出した。上記キットでゲノムDNAを抽出した後、RNase AでRNAを分解除去した。その後、アガロースゲルで電気泳動し、ゲノムDNAを確認した。

(2) ゲノムDNAを鋳型としたALS遺伝子のPCR

それぞれのゲノムDNAを鋳型とし、下記に示すプライマー「ALS-Rsp3」とプライマー「4-83-3」を用いてPCRを行った。PCRは、Ready to Go PCR Beads(アマシャムバイオサイエンス社製)を用い、最終容量25 μ 1で行った。反応条件としては、94°Cで5分間初期変性工程を行い、続いて、94°Cで30秒間の変性工程、55°Cで1分間のアニーリング工程及び72°Cで2分間の伸長工程からなるサイクルを40回行うものとし、最終サイクルの伸長工程を72°Cで9分間行うものとした。

次に、PCR反応液を2%アガロースゲルで電気泳動(100V, 1 X TBE buffer)した後、PCR生成物を含むゲルを切り出し、切り出したゲルを小さな断片に切断した。得られたゲル断片を滅菌イオン交換水で2、3度リンスした後、 500μ 1の滅菌イオン交換水を入れ、凍結・溶解を3回繰り返した。これにより、PCR生成物を水中に溶出することができた。

次に、このPCR生成物が溶存する溶出液を用いたPCRを再度行った。すなわち、 このPCRでは、溶液中に含まれるPCR生成物を鋳型とし、同一のプライマーセット



を用いるか、或いは内子のプライマー (nested primer) を用い、最終容量100 μ 1で行った。反応終了後、反応液を分取用アガロースゲル(1 %)で電気泳動した 後、目的のバンドを含むゲルを切り出し、GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit (アマシャムバイオサイエンス社製) を用いて精製した。そして、最終的に 75 μ 1の滅菌脱イオン水でPCR生成物を溶出した。

(3) シークエンシング

PCRにより増幅されたDNA断片を鋳型として、ABI PRISM BigDye ver.2(アプライドバイオシステム社製)を用いてシークエンス反応を行った。シークエンス反応に際しては、鋳型DNAを11 μ 1、プライマー(3.2 pmol/ μ 1)を1 μ 1、pre-mixを8 μ 1とし、総容量を20 μ 1とした。シークエンス反応条件は、96℃で5分間の初期変性工程、続いて、96℃で5秒間の変性工程、50℃で5秒間のアニーリング工程及び60℃で4分間の伸長工程からなるサイクル40回行い、最終サイクルの伸長工程を60℃で9分間行うものとした。シークエンス反応後、AutoSeq G-50 column(アマシャム バイオテック社製)を用い反応液中の蛍光塩基をゲル濾過により除去し、ABIPRISM 310 DNA シークエンサーにより塩基配列を読んだ。

(4) 使用したプライマーの名称及び塩基配列

上記(2)で用いたプライマー及び、以下の実施例で使用したプライマーについて、名称及び塩基配列等を表6にまとめた。



表6

名称	塩基配列	方向	対応 ALS 部位	塩基数
ALS-Rsp1	5' -GCTCTGCTACAACAGAGCACA-3'	センス	1192-1212	21mer
ALS-Rsp2	5'-AGTCCTGCCATCACCATCCAG-3'	アンチセンス	1906-1926	21mer
ALS-Rsp3	5'-CTGGGACACCTCGATGAAT-3'	センス	720-738	19mer
ALS-Rsp4	5'-CAACAAACCAGCGCAATTCGTCACC-3'	アンチセンス	862-886	25mer
ALS-Rsp6	5'-CATCACCAACCACCTCTT-3'	センス	327-344	18mer
ALS-Rsp7	5'-AACTGGGATACCAGTCAGCTC-3'	アンチセンス	886-906	21mer
ALS-RspA	5'-TGTGCTTGGTGATGGA-3'	アンチセンス	571-586	16mer
ALS-RspB	5'-TCAAGGACATGATCCTGGATGG-3'	センス	1913-1944	16mer
ALS-RspC	5'-CAGCGACGTGTTCGCCTA-3'	センス	258-275	16mer
ALS-RspD	5'-CCACCGACATAGAGAATC-3'	アンチセンス	828-845	18mer
ALS-RspF	5'-ACACGGACTGCAGGAATA-3'	アンチセンス	1749-1766	18mer
ALS-RspE	5'-TTACAAGGCGAATAGGGC-3'	センス	1656-1673	18mer
3-1-1	5'-GCATCTTCTTGATGGCG-3'	アンチセンス	1791-1807	17mer
3-1-2	5'-ATGCATGGCACGGTGTAC-3'	センス	973-990	18mer
3-1-3	5'-GATTGCCTCACCTTTCG-3'	アンチセンス	1346-1362	17mer
3-1-4	5'-AGGTGTCACAGTTGTTG-3'	センス	1506-1522	17mer
4-83-1	5'-AGAGGTGGTTGGTGATG-3'	アンチセンス	327-343	17mer
4-83-3	5'-GCTTTGCCAACATACAG-3'	アンチセンス	1944-1960	17mer
4-83-10	5'-CAGCCCAAATCCCATTG-3'	アンチセンス	1457-1473	17mer
4-83-15	5'-ATGTACCCTGGTAGATTC-3'	アンチセンス	735-752	18mer
ALS-DG7	5'-GTITT (CT) GCITA (CT) CCIGG (ACGT) GG-3'	センス	265-284	20mer

なお、表 6 中、対応 ALS 部位は、転写開始コドン(ATG)を起点とした場合の対応する塩基の番号である。また、ALS-Rsp1 の塩基配列は配列番号9に示し、ALS-Rsp2 の塩基配列は配列番号10に示し、ALS-Rsp3 の塩基配列は配列番号11に示し、ALS-Rsp4 の塩基配列は配列番号12に示し、ALS-Rsp6 の塩基配列は配列番号13に示し、ALS-Rsp7 の塩基配列は配列番号14に示し、ALS-RspA の塩基配列は配列番号15に示し、ALS-RspB の塩基配列は配列番号16に示し、ALS-RspC の塩基配列は配列番号17に示し、ALS-RspD の塩基配列は配列番号18に示し、ALS-RspF の塩基配列は配列番号18に示し、ALS-RspF の塩基配列は配列番号19に示し、ALS-RspE の塩基配列は配列番号20に示し、3-1-1の塩基配列は配列番号21に示し、3-1-2の塩基配列は配列番号2



2に示し、3-1-3の塩基配列は配列番号23に示し、3-1-4の塩基配列は配列番号 2 4 に示し、4-83-1 の塩基配列は配列番号 2 5 に示し、4-83-3 の塩基配列は配列 番号26に示し、4-83-10の塩基配列は配列番号27に示し、4-83-15の塩基配列 は配列番号28に示し、ALS-DG7の塩基配列は配列番号29に示した。

(5) シークエンスの結果明らかになった各系統における変異

上記 (3) で決定した塩基配列解析の結果、Rb系統、Vg系統、Ga系統及びSr系 統の変異が明らかとなった。各系統の変異点を表7にまとめる。

表	7
	_

2.				
変異塩基	C512A	C514A	G1643T	G1880T
変異アミノ酸	P171H	R172S	W548L	S627I
Rb 系統	○ ホモ	O ヘテロ		
Vg 系統			〇 ヘテロ	
0 7 St	. 0	0	〇 ヘテロ	
Ga 系統	ホモ又はヘテロ	ホモ又はヘテロ		
Sr 系統	,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,		〇 ヘテロ	〇 ヘテロ

表 7 に示すように、Rb 系統株では塩基配列における 512 番目の Cが A にホモに、 1643 番目の G が T にヘテロに変異していた。これはアミノ酸レベルでは 171 番目 のプロリンと 548 番目のトリプトファン(W) がそれぞれヒスチジン(H) とロイシン (L)に変異していることを意味している。Vg 系統株では塩基配列における 1643 番 目の G が T にヘテロに変異しており、これはアミノ酸レベルでは 548 番目のトリ プトファン(W)がロイシン(L)に変異していることになる。Ga 系統株では塩基配列 における 512 番目と 514 番目の C が A にホモかヘテロ(得られた PCR 生成物により 異なっていた)に、1643 番目の G が T にヘテロに変異していた。これはアミノ酸 レベルでは 171 番目のプロリン(P)と 172 番目のアルギニン(R) 及び 548 番目のト リプトファン(W)がそれぞれヒスチジン(H)、セリン(S)及びロイシン(L)に変異し ていることを意味している。また Sr 系統株では塩基配列における 1643 番目と・ 1880 番目の双方の Gが Tにヘテロに変異していた。



上述した方法で Sr 系統株の cDNA ライブラリーから ALS 遺伝子をスクリーニングして単離した際、2 点変異型遺伝子だけではなく野性型の遺伝子の遺伝子も単離されたことからゲノム DNA レベルではヘテロに変異していると推定していたが、ゲノム PCR による結果もそれを裏付ける結果となった。

以上のように全ての抵抗性変異株で 548 番目のトリプトファン(W)はヘテロにロイシン(L)に変異しており、 V_g 系統がこの変異のみを有していた。上述したように bispyribac-sodium に対する感受性は V_g 系統株では $10\,\mu$ M まで、Sr、Rb、Ga 系統株では $100\,\mu$ M まで抵抗性を示していた。このことから抵抗性の獲得はその淘汰圧の強度が強くなると共に V_g 系統を起点にその他の系統に分岐し変異していったと推察された。

[実施例5] G1643T (W548L) 及びG1880T (S627I) のそれぞれの変異を単独で持つALS cDNAの合成とこれを保持するpGEX 2Tの作製並びにこのベクターによる大腸菌の形質転換

先ず、G1643T (W548L) 及びG1880T (S627I) のそれぞれの変異を単独で持つ ALS cDNA の合成とこれを保持する pGEX 2T の作製について、図 2 0 を用いて説明する。 pBluescript II SK+(ALS-2 point mutant)或いは pBluescript II SK+(ALS-wild) の 1 μ 1 (各々585 ng/μ 1 及び 554 ng/μ 1) を鋳型として、LA Taq DNA polymerase (Takara 社製) の 1 μ 1 を用い、最終反応量 100 μ 1 で PCR を行った。反応条件は 95℃で 30 秒間、55℃で 30 秒間及び 72℃で 2 分間からなるサイクルを 25 回繰り返した。なお pBluescript II SK+(ALS-2 point mutant)は、G1643T(W548L)及び G1880T(S627I)の 2 点変異型の ALS 遺伝子を含んでいる。pBluescript II SK+(ALS-wild)は、変異を持たない野生型の ALS 遺伝子を含んでいる。PCR に際して、プライマーは ALS-Rsp6 と ALS-RspF の組み合わせ及び ALS-RspE と M13R の組み合わせを用いた。鋳型となる ALS 遺伝子と所定の組合せのプライマーとにより増幅される断片の名称を表 8 にまとめた。なお、プライマーM13R は、pBluescript II SK+の T3 プロモーター近傍のアンチセンスプライマーである。また、M13R の塩基配列は、5′-GGAAACAGCTATGACCATG-3′(配列番号30)である。

表 8

·	pBluescript II	pBluescript II	
	SK+(ALS-2 point mutant)	SK+(ALS-wild)	
ALS-Rsp6	PCR-1	PCR-3	
ALS-RspF	TON 1		
ALS-RspE	PCR-2	PCR-4	
M13R	r CR Z		

PCRによって得られたPCR-1、PCR-2、PCR-3及びPCR-4をそれぞれアガロースゲル電気泳動で分離した後、アガロースゲルから前述と同様に回収し、 $50 \mu 1$ 滅菌水で溶出した。

次に、PCR-1及びPCR-4のセットと、PCR-2及びPCR-3のセットとを用いてSPR(self polymerase reaction)に供した。SPRは、PCR-1及びPCR-4のセット或いはPCR-2及びPCR-3のセット23.5 μ 1とLA Taq DNA polymerase 1μ 1とを加え、最終容量75 μ 1とし、95 $\mathbb C$ で1分間の変性工程、55 $\mathbb C$ で30秒間のアニーリング工程及び72 $\mathbb C$ で2分間の伸長工程からなるサイクルを25回行うものとした。PCR-1及びPCR-4のセットを用いたSPRで得られたDNA断片をSPR-1とし、PCR-2及びPCR-3のセットを用いたSPRで得られたDNA断片をSPR-2とした。

なお、本例では、十分量のSPR-1とSPR-2と確保するため、精製されたSPR-1或いはSPR-2を鋳型とし、ALS-Rsp6及びM13Rを用いて再度LA Taq DNA polymeraseにより最終反応量 $100\,\mu$ 1でPCRをそれぞれ行った。このときのPCRは、95℃で30秒間の変性工程、55℃で30秒間のアニーリング工程及び72℃で2分間の伸長工程からなるサイクルを25回繰り返した。このPCRの後、反応溶液をアガロースゲル電気泳動に供し、約2 kbpのシングルバンド(PCR産物)をアガロースゲルから回収し、 $100\,\mu$ 1滅菌水で溶出した。

次に、PCRによって増幅したSPR-1とSPR-2をAcc I及びEco RIによりそれぞれ消化し、SPR-1(Acc I/Eco RI消化断片)とSPR-2(Acc I/Eco RI消化断片)を得た。すなわち、PCR産物が溶存する 100μ 1の滅菌水のうち 50μ 1を、 $10 \times M$ buffer (Tak ara社製)存在下、Acc I 1μ 1 ($12u/\mu$ 1)及びEco RI 1μ 1 ($12u/\mu$ 1)と混合し、最



終容量 $60 \mu 1$ で37 $^{\circ}$ $^{\circ}$ 、1時間インキュベートした。その後、反応溶液全量をアガロースゲル電気泳動に供し、目的の1.5 kbpの断片をGFX PCR and Gel Purification Kitで回収した。回収した1.5 kbpの断片を $50 \mu 1$ の滅菌水で溶出することによって、SPR-1(Acc I/Eco RI消化断片)を含む溶液とSPR-2(Acc I/Eco RI消化断片)を含む溶液とを調製した。

一方、野性型ALS遺伝子が組み込まれたタンパク質発現ベクター、pGEX-2T (ALS -wild) プラスミド (濃度約50 ng/ μ 1)の150 μ 1を、10 X M buffer存在下でAcc I 1μ 1(12 u/ μ 1, Takara社製) と混合し、37℃で2時間インキュベートした。反応終了後、1 %アガロースゲル電気泳動により直鎖状になった7.2 kbpのバンドを確認した。GFX PCR and Gel Purification Kitのプロトコルに従いこのアガロースゲルから、7.2 kbpのバンドに相当するDNAを回収後、180 μ 1の滅菌水で溶出した。その内89 μ 1を、10 μ 1の10 x H buffer(Takara社製)及び1 μ 1のEco RI(12u/ μ 1)と混合し、37℃で1分間反応することによって、回収したDNAをEco RIで部分消化した。反応終了後、10 x loading bufferを加え、1.5 %アガロースゲルで電気泳動したところ、4.9 kbp、5.7 kbp、6.5 kbp及び全く切断されない7.2 kbpのバンドに分かれ、目的の5.7 kbpのバンドをゲルから切り出した。切り出したゲルに含まれる約5.7 kbpのDNA断片を、GFX PCR and Gel Purification Kitにより回収し、その後、50 μ 1の滅菌水で溶出した。

そして、このようにして得られたpGEX-2T(ALS-wild)のAcc I消化及びEco RI部分消化断片の 3μ 1とSPR-1(Acc I/Eco RI消化断片)或いはSPR-2(Acc I/Eco RI消化断片)の 3μ 1とを、それぞれTakara ligation buffer (ver. 2, I液) 6μ 1と16℃で1晩反応させた。

次に、反応液を大腸菌コンピテントセル(JM109株、Takara社製)に添付のプロトコルに従ってそれぞれ形質転換し、アンピシリン50ppmを含むLB培地に播き、37℃で1晩インキュベートした。この結果、現れたコロニーの中から数点を選び、表6に記載したALS-RspE及びPGEX-3(5'-CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG-3':配列番号31)のセットと、PGEX-5(5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3':配列番号32)及びPGEX-3のセットと、PGEX-5及び表6に記載したALS-RspAのセットとを用いてコロニーを鋳型にしてダイレクトにPCRを行った。なお、PGEX-3は、ベクターとして



使用したpGEX-2Tの3'側に位置するアンチセンス鎖の一部と同じ配列である。PGE X-5は、ベクターとして使用したpGEX-2Tの5'側に位置するセンス鎖の一部と同じ配列である。反応条件としては、ALS-RspE/PGEX-3セットのときには、総量25 μ 1 中、各々のプライマーを 1μ MとPCR bead1個を溶解し、95℃で30秒間の変性工程、55℃で1分間のアニーリング工程及び72℃で2分間の伸長工程からなるサイクルを40回繰り返した。またPGEX-5/PGEX-3セット及びPGEX-5/ALS-RspAセットの場合には、上流部分にGCコンテントが75%程度の領域があるので、上記の溶液に更に最終濃度が5%のDMSOを加えた。このPCRの結果、所望のインサートが挿入されていることを確認した。

所望のインサートの挿入が確認されたコロニー1点を取り、アンピシリン50ppmを含有するLB液体培地 (3 ml 10本) にて、37 $\mathbb C$ で12時間振とう培養した。培養後、プラスミド抽出装置 (TOMY社製 DP-480) で培地からプラスミドを抽出 (400 $\mathbb C$ 50 0 μ 1程度) した後、遠心濃縮により200 μ 1程度まで濃縮した。その後、GFX PCR and Gel Purification Kitを用いて精製及び脱塩し、最後に130 μ 1程度の滅菌水で溶出した。

これらのプラスミドをABI PRISM BigDye ver. 2を用いてシークエンス反応を行い、プラスミドに含まれるインサートの塩基配列を解析した。シークエンス反応に際して、反応溶液は、 $11\mu1$ の鋳型DNAと、 $1\mu1$ のプライマー($3.2pmo1/\mu1$)と、 $8\mu1$ のpre-mixとを混合して調製し、総容量を $20\mu1$ とした。シークエンス反応条件としては、96℃で5分間の初期変性工程の後、96℃で5秒間の変性工程、50℃で5秒間のアニーリング工程及び60℃で4分間の伸長工程からなるサイクルを40回繰り返し、最終サイクルの伸長工程は60℃で9分間行うものとした。シークエンス反応終了後、AutoSeq G-50 columnを用い反応液中の蛍光塩基をゲル濾過により除去し、ABI PRISM 310 DNA シークエンサーにより塩基配列を決定した。

なお、シークエンス反応に際しては、表 6 に記載したプライマーのうち、センスプライマーとしてPGEX-5、ALS-RspC、ALS-Rsp3、ALS-Rsp1、3-1-4及びALS-RspBを用い、アンチセンスプライマーとして4-83-3、PGEX-3、ALS-Rsp2、4-83-10及びALS-Rsp7を用いた。

解析の結果、W548L変異を有する変異ALS遺伝子を有するpGEX 2Tベクター(図2



Oにおいて、「pGEX 2T(ALS-W548L mutant)」と記載)及びS627I変異を有する変異型ALS遺伝子を有するpGEX 2Tベクター (図20において、「pGEX 2T(ALS-S627I mutant)」と記載)が得られたことを確認した。次いで、これらpGEX 2T(ALS-W548 L mutant)及びpGEX 2T(ALS-S627I mutant)で大腸菌を形質転換した。

[実施例 6] Rb系統のゲノムPCRにより見い出されたC512A (P171H) 変異及びGa 系統のゲノムPCRにより見い出されたC514A (R172S) 変異をそれぞれ単独で持つA LS cDNAの合成とこれを保持するpGEX 2Tの作製ならびにこのベクターによる大腸 菌の形質転換

先ず、C512A (P171H) 及び C514A (R172S) のそれぞれの変異を単独で持つ ALS cDNA の合成とこれを保持する pGEX 2T の作製について、図 21 及び 22 を用いて説明する。

C512A (P171H) 変異DNA断片を得るため、Rb系統のゲノムDNAを鋳型として、表 6 に記載したALS-Rsp6及びALS-Rsp4のプライマーセットを用いてPCRを行った。P CRはReady to Go PCR Beadsを用い、鋳型のゲノムDNAを 5μ 1、各々のプライマー(2 $5pmo1/\mu$ 1)を 1μ 1加え、最終容量 25μ 1で行った。反応条件としては、95℃で5分間の初期変性工程の後、95℃で30秒間の変性工程、55℃で1分間のアニーリング工程及び72℃で2分間の伸長工程からなるサイクルを40回繰り返し、最終サイクルの伸長工程を72℃で9分間行うものとした。

PCR反応終了後、反応溶液を2 %アガロースゲルで電気泳動に供し、アガロースゲルからPCR生成物(図21において「PCR-5」と記載)のバンドを切り出し、GF X PCR DNA & Gel Band Purification Kitにより精製した。次に、精製したPCR-5をPCR産物クローニング用ベクター(TAクローニングベクター)であるpT7Blue T-vector (Novagen社製)に組み込んだ。すなわち、精製したPCR生成物1 μ 1を、 1μ 1のpT7Blue T-vector(50 ng/ μ 1)、 3μ 1の滅菌脱イオン水及び5 μ 1のligation buffer(ver. 2,I液,宝酒造社製)と混合し、16℃で1晩反応させた。

反応終了後、反応液全量を大腸菌(JM109株)へ定法に従い形質転換した。アンピシリン50 ppmを含むLB固体培地上で培養後、実施例 5 と同様にして、出現したシングルコロニーから目的のシークエンスを有するもの選別した。選別したシング



ルコロニーを、アンピシリン50 ppmを含むLB液体培養液(3 ml 10本)で、37℃で12時間振とう培養した。培養後、プラスミド抽出装置(TOMY社製 DP-480)でプラスミドを抽出(400~500 μ 1)した。これを遠心濃縮により200 μ 1程度まで濃縮して、GFX PCR and Gel Purification Kitで精製及び脱塩し、80 μ 1程度の滅菌水で溶出した。

次に、溶出液のうち 50μ 1を、 10μ 1の10 X T buffer及び 10μ 1の0.1 %BSA存在下で、 1μ 1のAcc I($12u/\mu$ 1)及び 1μ 1のSma I ($10u/\mu$ 1) と混合し総量 100μ 1とし、37℃で2時間インキュベートした。反応終了後、反応液をアガロースゲル電気 泳動に供し、目的のバンドを切り出して回収し、GFX PCR and Gel Purification Kitのプロトコルに従ってDNA断片を回収した。これにより、末端にSma Iサイトと ACC Iサイトを持つC512A (P171H) 変異DNA断片を得た。

一方、C514A変異及びC512A変異が近接しているため、Gb系統から抽出したゲノムDNAを鋳型としたPCRでは、C514A(R172S)変異のみを有するDNA断片を得ることができない。したがって、図21に示すように、予め変異点を導入した一対のプライマーを用いることで、C514A(R172S)変異のみを有するDNA断片を調製した。即ち、変異点の入ったプライマーとしてALS-M1(5'-CCCCAGCCGCATGATCGGCACCGACGCTT-3':配列番号33、下線のAが変異点)とALS-M2(5'-CGGTGCCGATCATGCGGCTGGGACCT-3':配列番号34、下線のTが変異点)を用い、野性型ALS cDNAが組み込まれたpBluescript II SK+を鋳型とし、ALS-Rsp6及びALS-M2のプライマーセットとALS-M1及びALS-Rsp4のプライマーセットとを用いてそれぞれPCRを行った。なお、ALS-M1における1~23番目の塩基配列とが相補的な部分である。ALS-Rsp6及びALS-M2のプライマーセットを用いた場合には図21中「PCR-6」と記載したDNA断片が増幅され、ALS-M1及びALS-Rsp4のプライマーセットを用いた場合には図21中「PCR-7」と記載したDNA断片が増幅される。

PCRに際して、反応溶液は、 $1\mu1$ のLA Taq DNA polymerase(5units/ $\mu1$ 、TAKA RA社製)、 $10\mu1$ の10 X LA buffer、 $10\mu1$ の25 mM MgCl $_2$ 、 $16\mu1$ のdNTPs(それぞれ25 mMのdATP、dGTP、dCTP及びdTTPからなる)、 $1\mu1$ の鋳型DNA、それぞれ $4\mu1$ のセンスプライマー及びアンチセンスプライマー(それぞれ25 pmol/ $\mu1$)を総量 $100\mu1$ に溶解したものを調製した。反応条件としては、95℃で5分間の初期変性工



程の後、95℃で30秒間の変性工程、55℃で1分間のアニーリング工程及び72℃で2分間の伸長工程からなるサイクルを25回繰り返し、最終サイクルの伸長工程を72℃で9分間行うものとした。

反応終了後、反応液を分取用1.5 %アガロースゲルで電気泳動に供し、目的の2 13 bp (PCR-6) と377 bp (PCR-7) のバンドを切り取り、GFX PCR DNA & Gel Ban d Purification Kitにより精製した後、生成したDNA断片をそれぞれ100 μ lの滅菌脱イオン水で溶出した。

次に、得られたPCR-6及びPCR-7を用いてSPRを行った。SPRに際して、反応液は、得られた溶出液のうち 30μ 1を、 1μ 1のLA Taq DNA polymerase(5units/ μ 1)、1 0μ 1の10 X LA buffer、 10μ 1の25mM MgCl₂、 16μ 1のdNTPs(それぞれ25mMのdAT P、dGTP、dCTP及びdTTPからなる)と混合して総量 100μ 1に調製した。SPR条件としては、95℃で5分間の初期変性工程の後、95℃で30秒間の変性工程、55℃で1分間のアニーリング工程及び72℃で2分間の伸長工程からなるサイクルを40回繰り返し、最終サイクルの伸長工程を72℃で9分間行うものとした。

反応終了後、反応液を分取用アガロースゲル(1.5%)電気泳動に供し、目的の56 0 bpのバンド (図21において「SPR-3」と記載)を切り出し、GFX PCR DNA & G el Band Purification Kitにより精製し、生成したDNA断片 (SPR-3) を100 μ 1の 滅菌脱イオン水で溶出した。これを先に述べた方法と同様に、pT7Blue T-vector に組み込み、大腸菌 (JM109) に形質転換した。この大腸菌を培養し、抽出されたプラスミドをAcc IとSma Iで消化して、末端にSma IサイトとACC Iサイトを持つC 514A (R172S) 変異DNA断片を得た。

他方、野性型ALS遺伝子が組み込まれたプラスミド、pGEX-2T (ALS-wild)で形質 転換された大腸菌 (JM109株)を、アンピシリン50ppmを含むLB液体培地 (2ml x 15本)にて37℃で1晩振とう培養した。プラスミド抽出装置 (DP-480) でプラスミド を抽出後、抽出液 (約750 μ 1) を減圧遠心濃縮器で200 μ 1程まで濃縮した。その後、GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kitにより脱塩し、最終的にプラスミドを200 μ 1の滅菌脱イオン水で溶出した。

次に、得られたプラスミド、pGEX-2T(ALS-wild)をAcc Iで消化した。すなわち、 溶出液のうち75 μ 1を、9 μ 1の10 X M buffer、3 μ 1のAcc I (12 u/μ 1) 及び3 μ 1



の滅菌脱イオン水と混合し、37℃で3時間反応した。反応終了後、反応液を1.5 % 分取用アガロースゲル電気泳動に供し、目的のバンドを切り出して回収した後、GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kitにより精製し、最終的に100 μ1の滅菌脱イオン水でDNA断片を溶出した。

次に、Acc Iで消化されたpGEX-2T(ALS-wild)を、Sma Iで部分消化した。すなわ ち、溶出液のうち79 μ lを、10 μ lの10 X T buffer、10 μ lの0.1 % BSA、1 μ lのS ma I(10 u/µ1)と混合して総量100µ1とし、30℃で1分間インキュベートした。な お、pGEX-2T(ALS-wild)には、3箇所のSma I認識配列 (pGEX-2TのThrombin切断サ イトに隣接するマルチクローニングサイト上、ALS遺伝子276番目及び430番目)が あるため、短時間で部分消化した。反応終了後、反応液をアガロースゲル電気泳 動に供し、ALS遺伝子430番目のSma I認識配列のみを消化したプラスミドに相当す るバンドを切り出して回収し、GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kitを用い て酵素・タンパク質を除去して精製した。そして、最終的に滅菌脱イオン水50μ1 で溶出した。このAcc I消化/Sma I部分消化処理したpGEX-2T-野性型ALS cDNA断片 と、上述の方法で得られた末端にSma IサイトとACC Iサイトを有するC512A (P17 1H) 変異DNA断片並びにC514A (R172S) 変異DNA断片を定法によりライゲーション した。なお、図22において、この方法により得られたC512A (P171H) 変異のみ を単独で有する変異ALS遺伝子を含むプラスミドを「pGEX-2T(ALS P171H mutant)」 と記載し、C514A (R172S)変異のみを単独で有する変異ALS遺伝子を含むプラスミ ドを「pGEX-2T(ALS R172S mutant)」と記載する。

その後、反応液の全量を用いて大腸菌(JM109株)に形質転換し、アンピシリンを含むLB培地上で出現したシングルコロニーを、上述した方法と同様に、PCRによりスクリーニングし、pGEX-2T(ALS P171H mutant)で形質転換された大腸菌及びpGE X-2T(ALS R172S mutant)で形質転換された大腸菌を選抜した。

[実施例7] C512A(P171H)/C514A(R172S)の2点変異型ALS cDNAの合成とこれを保持するpGEX-2Tの作製並びにこのベクターによる大腸菌の形質転換

C512A (P171H) / C514A (R172S) の2点変異型ALS cDNAの合成とこれを保持するpGEX - 2Tの作製について、図23を用いて説明する。



C512A(P171H)/C514A(R172S)の2点変異型ALS cDNAの合成は、上述の実施例 6 に記載した方法に準じ、Ga系統から抽出したゲノムDNAを鋳型としたPCRで行った。すなわち、Ga系統から抽出したゲノムDNAを鋳型とし、ALS-Rsp6及びALS-Rsp4をプライマーセットとしてPCRを行い、図 2 3 中「PCR-8」と記載したDNA断片を増幅した。そして、増幅したDNA断片をpT7Blue T-vectorにライゲーションした後、これをAcc I及びSma Iで消化することによって、C512A(P171H)/C514A(R172S)変異DNA断片を得た。次に、図 2 2に示したように、Acc I消化/Sma I部分消化処理したpGEX-2T-野性型ALS cDNA断片と、C512A(P171H)/C514A(R172S)変異DNAとを定法によりライゲーションした。これにより、pGEX-2T(ALS P171H, R172S mutant)を作製した。また、実施例 6 と同様にして、pGEX-2T(ALS P171H, R172S mutant)で形質転換された大腸菌を作製した。

〔実施例 8〕 C512A (P171H) /G1643T (W548L) 及びC512A (P171H) /G1880T (S627I) の2 点変異型ALS cDNAの合成とこれを保持するpGEX-2Tの作製並びにこのベクターに よる大腸菌の形質転換

C512A (P171H) /G1643T (W548L) 及びC512A (P171H) /G1880T (S627I) の2点変異型ALS cDNAの合成とこれを保持するpGEX-2Tの作製について、図24を用いて説明する。

先ず、実施例 5 で得たpGEX 2T (ALS-W548L mutant)を、実施例 6 の方法に準じて、Acc Iで消化した後にSma Iで部分消化することによって、ALS遺伝子における430番目のSma I認識配列からAcc I認識配列までを欠失させる。次に、これと実施例 6 で作製したC512A (P171H) 変異断片とをライゲーションすることによって、C512A (P171H) /G1643T (W548L) 2点変異型ALS cDNAを含むプラスミド (図 2 4 中、「pGEX -2T (ALS-P171H, W548L mutant)」と記載)を作製した。

一方、pGEX 2T(ALS-W548L mutant)の代わりに、実施例 5 で得たpGEX 2T(ALS-S 627I mutant)を用いることによって、同様にして、C512A(P171H)/G1880T(S627I) 2点変異型ALS cDNAを含むプラスミド (図 2 4 中、「pGEX-2T(ALS-P171H, S627I mutant)」と記載)を作製した。

さらに、これらpGEX-2T(ALS-P171H, W548L mutant)及びpGEX-2T(ALS-P171H, S62 7I mutant)を用いて、実施例6の方法と同様にして、大腸菌を形質転換した。



[実施例9] C512A(P171H)/G1643T(W548L)/G1880T(S627I)の3点変異型ALS cDNAの合成とこれを保持するpGEX-2Tの作製並びにこのベクターによる大腸菌の形質転換

C512A(P171H)/G1643T(W548L)/G1880T(S627I)の3点変異型ALS cDNAの合成とこれを保持するpGEX-2Tの作製について、図25を用いて説明する。

先ず、実施例 5 で得たpGEX 2T (ALS-S627I mutant)をXho Iで消化した後、定法に従ってBAP処理を行う。次に、上述した方法に準じて、目的の遺伝子断片(ベクター側)をアガロースゲルから分離・精製した。また、実施例 5 で得たpGEX 2T (ALS-W548L mutant)をXho Iで消化し、上述した方法に準じて、当該変異を含む断片をアガロースゲルから分離・精製した。

次に、G1880T(S627I)とG1643T(W548L)の2点変異を併せ持つ「pGEX-2T(ALS-W548L, S627I mutant)」を作製する目的で、得られたDNA断片それぞれをライゲーション反応に供した。反応終了後、反応液全量を用いて大腸菌(JM109株)に形質転換し、アンピシリンを含むLB培地上で出現したシングルコロニーを、上述した方法に準じてPCRによりスクリーニングし、目的のプラスミド(pGEX-2T(ALS-W548L, S627I mutant))を持つ大腸菌を選抜した。

選抜した大腸菌を培養後、上述した方法に準じて、pGEX-2T (ALS-W548L, S627I mutant)を調製した。pGEX-2T (ALS-W548L, S627I mutant)をAcc I消化した後、Sma Iによる部分消化を行い、ALS遺伝子における430番目のSma I認識配列からAcc I認識配列までを欠失させたpGEX-2T (ALS-W548L, S627I mutant)を作製した。次に、これと実施例 6 で作製したC512A (P171H) 変異断片とをライゲーションすることによって、C512A (P171H) /G1643T (W548L) /G1880T (S627I) 3点変異型ALS cDNAを含むプラスミド (図 2 5 中、「pGEX-2T (ALS-P171H, W548L, S627I mutant)と記載」)を作製した。

さらに、pGEX-2T(ALS-P171H, W548L, S627I mutant)を用いて、実施例6の方法と同様にして、大腸菌を形質転換した。

[実施例10] 変異型ALSタンパク質の発現



実施例3(5)で作製したpGEX-2T(ALS-wild)で形質転換した大腸菌、実施例5で作製したpGEX 2T(ALS-W548L mutant)で形質転換した大腸菌、実施例5で作製したpGEX 2T(ALS-S627I mutant)で形質転換した大腸菌、実施例6で作製したpGEX-2T(ALS P171H mutant)で形質転換された大腸菌、実施例6で作製したpGEX-2T(ALS R172S mutant)で形質転換された大腸菌、実施例7で作製したpGEX-2T(ALS P17 1H, R172S mutant)で形質転換された大腸菌、実施例8で作製したpGEX-2T(ALS-P1 71H, W548L mutant)で形質転換された大腸菌、実施例8で作製したpGEX-2T(ALS-P1 71H, W548L mutant)で形質転換された大腸菌、実施例8で作製したpGEX-2T(ALS-P1 71H, W548L, S627I mutant)で形質転換された大腸菌及び実施例9で作製したpGEX-2T(ALS-P1 171H, W548L, S627I mutant)で形質転換された大腸菌を、2 m1のアンピシリンを含むLB液体培地にて27℃でそれぞれ振とう培養(前培養)した。この前培養液1 mlを用いて250 m1のアンピシリンを含むLB液体培地で、それぞれ本培養を行った。一晩培養後、1 mM IPTGを加えてさらに3時間~4時間培養することによって、GST融合タンパク質の発現誘導を行った。なお、菌体は洗浄後-80℃で保存した。

大腸菌からのALSの調製と精製は次の方法で行った。先ず、-80℃に保存しておいた大腸菌のペレットを、ALS抽出緩衝液(30 %グリセロールと $0.5\,$ mM MgCl $_2$ を含んだリン酸カリウム緩衝液pH 7.5)に懸濁した(培養液 $50\,$ mlから得られたペレットに対して $2.5\,$ mlのALS抽出緩衝液を添加)。この懸濁液を超音波処理(Heat Systems-Ultrasonics社製、Sonicator W-225R、マイクロチップ、アウトプットコントロール8、約1秒インターバル、40秒2回)した後、4℃、15000×gで20分間遠心し、その上澄を粗酵素溶液とした。

これにより、GST融合野生型ALSタンパク質、GST融合W548L変異型ALSタンパク質、GST融合S627I変異型ALSタンパク質、GST融合P171H変異型ALSタンパク質、GST融合P171H次の異型ALSタンパク質、GST融合P171H/R172S変異型ALSタンパク質、GST融合P171H/W548L変異型ALSタンパク質、GST融合P171H/S627I変異型ALSタンパク質及びGST融合P171H/W548L/S627I変異型ALSタンパク質のNずれかを含む9種類の粗酵素溶液を調製した。

「実施例11] 変異型ALSタンパク質の薬剤感受性

実施例10で得た9種類の粗酵素溶液を用いて、野生型ALSタンパク質及び変異



型ALSタンパク質の薬剤感受性を調べた。薬剤感受性試験は、実施例2とほぼ同様な手順に従って行った。ただし、本例においては、反応温度を37℃、反応時間を30分間とし、また大腸菌由来のALS活性を阻害するために、反応液には10 mMのバリンを添加した。また、薬剤には、PC除草剤としてbispyribac-sodium、pyrithiobac-sodium及びpyriminobacの3種類を使用し、スルホニルウレア系除草剤としてchlorsulfuronを使用し、イミダゾリノン系除草剤としてimazaquinを使用した。これら薬剤は、変異型ALSタンパク質を添加する前に、これらの薬剤の所定の濃度の溶液(bispyribac-sodiumとpyrithiobac-sodiumは水溶液、その他はアセトン溶液)を反応液中に添加した。アセトンの最終濃度は1%とした。

9種類の粗酵素溶液について、bispyribac-sodiumによる阻害活性を図26及び27並びに表9に示し、pyrithiobac-sodiumによる阻害活性を表10に示し、pyriminobacによる阻害活性を表11に示し、chlorsulfuronによる阻害活性を表12に示し、imazaquinよる阻害活性を表13に示した。

表9~13中、薬剤による阻害活性は、供試濃度において50%阻害が得られる場合には、その50%阻害を与える濃度(I50値)で表し、50%阻害が得られない場合には供試濃度の最高濃度における阻害%で表した。また、表9~13中、予想RS比とは、複数の変異を有する変異型ALSタンパク質について、単独で変異を有する変異型ALSタンパク質のRS比から通常予測されるRS比を意味する。すなわち、予想RS比は、単独で変異を有する変異型ALSタンパク質のRS比から通常予測される相加効果を意味する。具体的には、複数の変異を有する変異型ALSタンパク質のRS比から通常予測される相加効果を意味する。具体的には、複数の変異を有する変異型ALSタンパク質に関する予想RS比は、当該複数の変異のうちいずれか1つの変異のみ有する変異型ALSタンパク質のRS比を無じることで算出した。複数の変異を有する変異型ALSタンパク質について実際のRS比が予想RS比を上回る場合、当該複数の変異を有する変異型ALSタンパク質について実際のRS比が予想RS比を上回る場合、当該複数の変異を有する変異型ALSタンパク質は、変異を単独で有する変異型ALSタンパク質の組み合わせから予想される相加効果の抵抗性を超える抵抗性を有するものである。



表 9

ALS タンパク質の種類	I50 値 (μM)	RS 比	予想 RS 比	RS 比/予想 RS 比
野性型	0.0063			
P171H 変異型	0.055 .	8.7		
R172S 変異型	0.0062	0.98		
W548L 変異型	3.3	520		
S627I 変異型	0.26	41		
P171H/R172S 変異型	0.048	7.6	8.5	0.89
P171H/W548L 変異型	100μMで5.5%	>15000	4500	>3.3
P171H/S627I 変異型	23	3700	360	10
P171H/W548L/S627I 変異型	型 100μMで1.1%	>16000	190000	>0.084
表10				
ALS タンパク質の種類	I50 値 (μM)	RS 比	予想 RS 比	RS 比/予想 RS 比
野性型	0.011			
P171H 変異型	0.037	3.4		
R172S 変異型	0.011	,1		
W548L 変異型	100μMで41%	>9100		
S627I 変異型	2.2	200		
P171H/R172S 変異型	0.14	13	3.4	3.8
P171H/W548L 変異型	100μMで20%	>9100	>31000	
P171H/S627I 変異型	9.4	850	680	1.3



ALS タンパク質の種類	I50 値(μ M)	RS 比	予想 RS 比	RS 比/予想 RS 比
野性型	0.008			
P171H 変異型	0.04	5		
R172S 変異型	0.0092	1.2		
W548L 変異型	36	4500		
S627I 変異型	22	2800		
P171H/R172S 変異型	0.041	5.1	6	0.85
P171H/W548L 変異型	100 μ M で 11%	>13000	23000	>0.57
P171H/S627I 変異型	100 μ M で 21%	>13000	14000	>0.93
表12				
ALS タンパク質の種類	I50 値(μ M)	RS 比	予想 RS 比	: RS 比/予想 RS 比
野性型	0.013			
P171H 変異型	1.1	85		
R172S 変異型	0.011	0.85		
W548L 変異型	9.9	760		
S627I 変異型	0.031	2.4		
P171H/R172S 変異型	5.5	420	72	5.8
P171H/W548L 変異型	100μMで16	% >7700	65000	>0.18
P171H/S627I 変異型	9.9	760	200	3.8
P171H/W548L/S627I 変異	型 500μΜで30	% >38000	160000	>0.24



表13

ALS タンパク質の種類	I50 値 (μM)	RS 比	予想 RS 比	RS 比/予想 RS 比
野性型	2.2			
P171H 変異型	3.4	1.5		
R172S 変異型	2.3	1		
W548L 変異型	100μMで16%	>45		
S627I 変異型	15	6.8		
P171H/R172S 変異型	3.9	1.8	1.5	1.2
P171H/W548L 変異型	100μ M で 13%	>45	>68	
P171H/S627I 変異型	71	32	10	3.2
P171H/W548L/S627I 変異型	100 μ M で 15%	>45	>460	

以上の表9~13のデータを順に説明する。

まず、bispyribac-sodiumによる阻害活性データ(表 9)からは次のことが明らかとなった。1点変異型遺伝子がコードする変異型ALSタンパク質(P171H、R172S、W548L及びS627I)の中では、W548L変異型ALSタンパク質がbispyribac-sodiumに対して最も高い抵抗性を示した(RS比が520)。S627I変異型ALSタンパク質又はP171H変異型ALSタンパク質も高い抵抗性を示した(それぞれ、RS比が41及び8.7)が、R172S変異型ALSタンパク質は野生型ALSタンパク質と同等の抵抗性しか示さなかった(RS比が0.98)。このことから、ALSタンパク質におけるP171H変異、W548L変異及びS627I変異は、bispyribac-sodiumに対する抵抗性を増強させるのに有効な変異であることが明らかとなった。また、ALSタンパク質におけるR172S変異は、サイレント変異であることが明らかとなった。

一方、2点変異型遺伝子がコードする変異型ALSタンパク質の中では、P171H/W548L変異型ALSタンパク質がbispyribac-sodiumに対して最も強い抵抗性を示した ($100\,\mu$ Mで5.5%の阻害、RS比は>15000)。P171H/S627I変異型ALSタンパク質もbispyribac-sodiumに対して強い抵抗性を示した (RS比が3700)。P171H/R172S変異型 ALSタンパク質の抵抗性の度合いは、P171H変異型ALSタンパク質とほぼ同じであった。また、3点変異型遺伝子によりコードされるP171H/W548L/S627I変異型ALSタンパク質もbispyribac-sodiumに対して強い抵抗性を与えた ($100\,\mu$ Mで1.1%の阻害、



RS比は>15000)。なお、これらの結果の元になった実際の薬剤用量応答結果は図26及び27に示した。

2点変異及び3点変異について、予想RS比と実際のRS比とを比較したところ、P171H/W548L変異型ALSタンパク質及びP171H/S627I変異型ALSタンパク質におけるRS比は、予想RS比を有意に上回っていた(RS比と予想RS比の比が1よりも明瞭に大きくなる)。このことから、これらの2つの2点変異型遺伝子(P171H/W548L変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子及びP171H/S627I変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子及びP171H/S627I変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子)は、bispyribac-sodiumに対して、1点変異型遺伝子の抵抗性の度合いから予想されるよりも強い抵抗性をALSタンパク質に与えることが判明した。

次に、pyrithiobac-sodiumによる阻害活性(表10)からは次のことが明らかになった。1点変異型遺伝子がコードする変異型ALSタンパク質(P171H、R172S、W 548L及びS627I)の中では、W548L変異型ALSタンパク質がpyrithiobac-sodiumに対して最も強い抵抗性を示した(100μMで41%、RS比は>9100)。S627I変異型ALSタンパク質も抵抗性を示した(RS比が200)が、P171H変異型ALSタンパク質の抵抗性の度合いは低く(RS比が3.4)、R172S変異型ALSタンパク質は野生型ALSタンパク質と同等の抵抗性しか示さなかった(RS比が0.85)。このことから、ALSタンパク質におけるP171H変異、W548L変異及びS627I変異は、Pyrithiobac-sodiumに対する抵抗性を増強させるのに有効な変異であることが明らかとなった。また、ALSタンパク質におけるR172S変異は、サイレント変異であることが明らかとなった。

一方、2点変異型遺伝子がコードする変異型ALSタンパク質で最も強い抵抗性を与えたのは、P171H/W548L変異型ALSタンパク質であり($100\,\mu$ Mで20%の阻害、RS比は>9100)、続いてP171H/S627I変異型ALSタンパク質であった(RS比が850)。表9に示したbispyribac-sodiumによる阻害活性データとは異なり、pyrithiobac-sodiumの場合、P171H/R172S変異型ALSタンパク質は、P171H変異型ALSタンパク質よりも高い度合いで抵抗性を示しており(RS比13)、単独ではサイレント変異であるR172S変異がP171H変異型ALSタンパク質の抵抗性の度合いを高めることが判明した。

また、2点変異型ALSタンパク質について、1点変異型ALSタンパク質のRS比から 予想される予想RS比と実際のRS比と比較したところ、P171H/R172S変異型ALSタン



パク質のRS比は予想RS比よりも有意に大きくなっていた(実際のRS比と予想RS比の比が1よも明確に大きくなる)。このことから、P171H/R172S変異型ALSタンパク質は、pyrithiobac-sodiumに対して、1点変異型遺伝子の抵抗性の度合いから予想されるよりも強い抵抗性を示すことが判明した。

次に、pyriminobacによる阻害活性(表 1 1)からは次のことが明らかになった。 1点変異型遺伝子 (P171H、R172S、W548L及びS627I) がコードする変異型ALSタンパク質の中では、W548L変異型ALSタンパク質がpyriminobacに対して最も強い抵抗性を示した (RS比4500)。S627I変異型ALSタンパク質も強い抵抗性を与えたが (RS比2800)、P171H変異型ALSタンパク質の抵抗性の度合いは低く (RS比5)、R172S変異型ALSタンパク質は野生型ALSタンパク質と同等の抵抗性しか示さなかった(RS比1.2)。このことから、ALSタンパク質におけるP171H変異、W548L変異及びS627I変異は、pyriminobacに対する抵抗性を増強させるのに有効な変異であることが明らかとなった。また、ALSタンパク質におけるR172S変異は、サイレント変異であることが明らかとなった。

2点変異型遺伝子がコードする変異型ALSタンパク質で最も強い抵抗性を与えたのは、P171H/W548L変異型ALSタンパク質であり(100μ Mで11%の阻害、RS比は>13000)、続いてP171H/S627I変異型ALSタンパク質であった(100μ Mで21%の阻害、RS比は>13000)。これらP171H/W548L変異型ALSタンパク質及びP171H/S627I変異型ALSタンパク質及びP171H/S627I変異型ALSタンパク質について、予想P171H/W548L変異型ALSタンパク質について、予想P171H/W548L変異型基ム子の抵抗性の度合いから予想されるよりも強い抵抗性を示すかどうかを明確にすることはできなかった。

次に、chlorsulfuronによる阻害活性(表12)からは次のことが明らかになった。1点変異型遺伝子がコードする変異型ALSタンパク質(P171H、R172S、W548L及びS627I)の中では、W548L変異型ALSタンパク質がchlorsurfuronに対して最も強い抵抗性を示した(RS比520)。P171H変異型ALSタンパク質も比較的強い抵抗性を示した(RS比85)が、S627I変異型ALSタンパク質の抵抗性の度合いは低く(RS比2.4)、R172S変異型ALSタンパク質は野生型ALSタンパク質と同等の抵抗性しか示さなかった(RS比0.85)。このことから、ALSタンパク質におけるP171H変異及びW548L変異は、chlorsulfuronに対する抵抗性を増強させるのに有効な変異であるこ



とが明らかとなった。また、ALSタンパク質におけるR172S変異は、サイレント変異であることが明らかとなった。

2点変異型遺伝子がコードする変異型ALSタンパク質で最も強い抵抗性を与えたのはP171H/W548L変異型ALSタンパク質であり($100\,\mu$ Mで16%の阻害、RS比は>7700)、続いてP171H/S627I変異型ALSタンパク質であった(RS比760)。表 9 に示したb ispyribac-sodiumによる阻害活性データとは異なり、chlorsulfuronの場合、P17 1H/R172S変異型ALSタンパク質の抵抗性の度合い(RS比420)はP171H変異型ALSタンパク質の抵抗性を示しており、単独ではサイレント変異であるR172S変異がP171H変異型ALSタンパク質の抵抗性の度合いを高めることが判明した。また、P171H/W548L/S627I変異型ALSタンパク質も強い抵抗性を与えた($50\,\mu$ Mで30%の阻害、RS比は>3800)。

P171H/R172S変異型ALSタンパク質及びP171H/S627I変異型ALSタンパク質について、予想RS比と実際のRS比と比較したところ、ともに実際のRS比は予想RS比よりも有意に大きくなっていた。このことから、P171H/R172S変異型ALSタンパク質及びP171H/S627I変異型ALSタンパク質は、chlorsurfuronに対して、1点変異型遺伝子の抵抗性の度合いから予想されるよりも強い抵抗性を示すことが判明した。

次に、Imzaquinによる阻害活性データ(表 1 3)からは次のことが明らかとなった。1点変異型遺伝子がコードする変異型ALSタンパク質(P171H、R172S、W548 L及びS627I)の中では、W548L変異型ALSタンパク質がimazaquinに対して最も強い抵抗性を示した(100μMで14%、RS比は>45)。S627I変異型ALSタンパク質も抵抗性を示した(RS比41)が、P171H変異型ALSタンパク質はほとんど抵抗性を示さなかった(RS比1.5)。R172S変異型ALSタンパク質は、野生型ALSタンパク質と同等の抵抗性しか示さなかった(RS比0.98)。このことから、ALSタンパク質におけるW548L変異及びS627I変異は、imazaquinに対する抵抗性を増強させるのに有効な変異であることが明らかとなった。また、ALSタンパク質におけるP171H変異及びR172S変異は、imazaquinに対してサイレント変異であることが明らかとなった。

2点変異型遺伝子で最も強い抵抗性を与えたのはP171H/W548L変異型ALSタンパク質であり(100μ Mで13%の阻害、RS比は>45)、続いてP171H/S627I変異型ALSタンパク質であった (RS比32)。P171H/R172S変異型ALSタンパク質の抵抗性の度合い



はP171Hの1点変異遺伝子とほぼ同じであった。また、P171H/W548L/S627I変異型ALSタンパク質も強い抵抗性を与えた(100 μ Mで15%の阻害、RS比は>45)。

これら 2 点変異型 ALS タンパク質及び 3 点変異型 ALS タンパク質について、予想 RS 比と実際の RS 比とを比較した結果、P171H/S627I 変異型 ALS タンパク質の RS 比は予想 RS 比よりも有意に大きくなっていた(実際の RS 比と予想 RS 比の比が明瞭に 1 よりも大きくなる)。このことから、P171H/S627I 変異型 ALS タンパク質は、imazaquin に対して、1 点変異型遺伝子の抵抗性の度合いから予想されるよりも強い抵抗性を示すことが判明した。

産業上の利用の可能性

以上、詳細に説明したように、本発明によれば、様々な除草剤に対して優れた 抵抗性を示すアセト乳酸シンターゼをコードする遺伝子、該遺伝子によりコード されるアセト乳酸シンターゼタンパク質、該遺伝子を有する組換えベクター、該 組換えベクターを有する形質転換体、該遺伝子を有する植物、該植物の育成方法 及び、該遺伝子を選択マーカーとして使用する形質転換細胞を選択する方法を提 供することができる。

配列表フリーテキスト

配列番号9~34はプライマーである。

配列番号29における第15番目のnはa,c,g又はtを表している。



請求の範囲

- 1. 以下の (a) 又は (b) のタンパク質をコードする遺伝子。
- (a) 配列番号2, 4, 6および8のいずれか1つに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。
- (b) 配列番号2, 4, 6および8のいずれか1つに記載のアミノ酸配列における少なくとも1以上のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、ピリミジニルカルボキシ除草剤に対する抵抗性を有し、アセト乳酸シンターゼ活性を有するタンパク質。
- 2. 請求項1記載の遺伝子によりコードされるアセト乳酸シンターゼタンパク質。
 - 3. 請求項1記載の遺伝子を有する組換えベクター。
 - 4. 請求項3記載の組換えベクターを有する形質転換体。
- 5. 請求項1記載の遺伝子を有し、ピリミジニルカルボキシ除草剤に対する 抵抗性を有する植物。
- 6. 請求項5記載の植物を、ピリミジニルカルボキシ除草剤存在下で育成することを特徴とする植物育成方法。
- 7. 請求項1記載の遺伝子を選択マーカーとして使用し、該遺伝子を有する形質転換細胞を選択する方法。



図1A

Wild P/R Mutant P/W Mutant P/S Mutant P/S/W Mutant	1 1 1 1	MATTAAAAAAALSAAATAKTGRKNHQRHHVLPARGRVGAAAVRCSAVSPVTPPSPAPPAT MATTAAAAAAALSAAATAKTGRKNHQRHHVLPARGRVGAAAVRCSAVSPVTPPSPAPPAT MATTAAAAAAALSAAATAKTGRKNHQRHHVLPARGRVGAAAVRCSAVSPVTPPSPAPPAT MATTAAAAAAALSAAATAKTGRKNHQRHHVLPARGRVGAAAVRCSAVSPVTPPSPAPPAT MATTAAAAAAALSAAATAKTGRKNHQRHHVLPARGRVGAAAVRCSAVSPVTPPSPAPPAT *********************************	60 60 60 60
Wild P/R Mutant P/W Mutant P/S Mutant P/S/W Mutant	61 61 61	PLRPWGPAEPRKGADILVEALERCGVSDVFAYPGGASMEIHQALTRSPVITNHLFRHEQG PLRPWGPAEPRKGADILVEALERCGVSDVFAYPGGASMEIHQALTRSPVITNHLFRHEQG PLRPWGPAEPRKGADILVEALERCGVSDVFAYPGGASMEIHQALTRSPVITNHLFRHEQG PLRPWGPAEPRKGADILVEALERCGVSDVFAYPGGASMEIHQALTRSPVITNHLFRHEQG PLRPWGPAEPRKGADILVEALERCGVSDVFAYPGGASMEIHQALTRSPVITNHLFRHEQG	120 120 120 120 120
Wild P/R Mutant P/W Mutant P/S Mutant P/S/W Mutant	121 121 121 121 121	EAFAASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLVSALADALLDSVPMVAITGGVPRRMIGTDAF EAFAASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLVSALADALLDSVPMVAITGGVHSRMIGTDAF EAFAASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLVSALADALLDSVPMVAITGGVHRRMIGTDAF EAFAASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLVSALADALLDSVPMVAITGGVHRRMIGTDAF EAFAASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLVSALADALLDSVPMVAITGGVHRRMIGTDAF	180 180 180 180 180
Wild P/R Mutant P/W Mutant P/S Mutant P/S/W Mutant	181 181 181	QETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRVIQEAFFLASSGRPGPVLVDIPKDIQQQMAVPV QETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRVIQEAFFLASSGRPGPVLVDIPKDIQQQMAVPV QETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRVIQEAFFLASSGRPGPVLVDIPKDIQQQMAVPV QETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRVIQEAFFLASSGRPGPVLVDIPKDIQQQMAVPV QETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRVIQEAFFLASSGRPGPVLVDIPKDIQQQMAVPV ***********************************	240 240 240 240 240 240
Wild P/R Mutant P/W Mutant P/S Mutant P/S/W Mutant	241 241 241	WDTSMNLPGYIARLPKPPATELLEQVLRLVGESRRPILYVGGGCSASGDELRWFVELTGI WDTSMNLPGYIARLPKPPATELLEQVLRLVGESRRPILYVGGGCSASGDELRWFVELTGI WDTSMNLPGYIARLPKPPATELLEQVLRLVGESRRPILYVGGGCSASGDELRWFVELTGI WDTSMNLPGYIARLPKPPATELLEQVLRLVGESRRPILYVGGGCSASGDELRWFVELTGI WDTSMNLPGYIARLPKPPATELLEQVLRLVGESRRPILYVGGGCSASGDELRWFVELTGI	300 300 300 300 300
Wild P/R Mutant P/W Mutant P/S Mutant P/S/W Mutant	301 301 301	PVTTTLMGLGNFPSDDPLSLRMLGMHGTVYANYAVDKADLLLAFGVRFDDRVTGKIEAFA PVTTTLMGLGNFPSDDPLSLRMLGMHGTVYANYAVDKADLLLAFGVRFDDRVTGKIEAFA PVTTTLMGLGNFPSDDPLSLRMLGMHGTVYANYAVDKADLLLAFGVRFDDRVTGKIEAFA PVTTTLMGLGNFPSDDPLSLRMLGMHGTVYANYAVDKADLLLAFGVRFDDRVTGKIEAFA PVTTTLMGLGNFPSDDPLSLRMLGMHGTVYANYAVDKADLLLAFGVRFDDRVTGKIEAFA ***********************************	360 360 360 360 360
Wild P/R Mutant P/W Mutant P/S Mutant P/S/W Mutant	361 361 361	SRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSICADVKLALQGLNALLQQSTTKTSSDFSAWHNELDQ SRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSICADVKLALQGLNALLQQSTTKTSSDFSAWHNELDQ SRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSICADVKLALQGLNALLQQSTTKTSSDFSAWHNELDQ SRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSICADVKLALQGLNALLQQSTTKTSSDFSAWHNELDQ SRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSICADVKLALQGLNALLQQSTTKTSSDFSAWHNELDQ ************************************	420 420 420 420 420
Wild P/R Mutant P/W Mutant P/S Mutant P/S/W Mutant	421 421 421	QKREFPLGYKTFGEEIPPQYAIQVLDELTKGEAIIATGVGQHQMWAAQYYTYKRPRQWLS QKREFPLGYKTFGEEIPPQYAIQVLDELTKGEAIIATGVGQHQMWAAQYYTYKRPRQWLS QKREFPLGYKTFGEEIPPQYAIQVLDELTKGEAIIATGVGQHQMWAAQYYTYKRPRQWLS QKREFPLGYKTFGEEIPPQYAIQVLDELTKGEAIIATGVGQHQMWAAQYYTYKRPRQWLS QKREFPLGYKTFGEEIPPQYAIQVLDELTKGEAIIATGVGQHQMWAAQYYTYKRPRQWLS ************************************	480 480 480 480 480
Wild P/R Mutant P/W Mutant	481	SAGLGAMGFGLPAAAGASVANPGVTVVDIDGDGSFLMNIGELALIRIENLPVKVMVLNNQ SAGLGAMGFGLPAAAGASVANPGVTVVDIDGDGSFLMNIGELALIRIENLPVKVMVLNNQ SAGLGAMGFGLPAAAGASVANPGVTVVDIDGDGSFLMNIQELALIRIENLPVKVMVLNNQ	540 540 540



図1B

P/S Mutant P/S/W Mutant	401	SAGLGAMGFGLPAAAGASVANPGVTVVDIDGDGSFLMNIQELALIRIENLPVKVMVLNNQ SAGLGAMGFGLPAAAGASVANPGVTVVDIDGDGSFLMNIQELALIRIENLPVKVMVLNNQ ***********************************	540 540
Wild P/R Mutant P/W Mutant P/S Mutant P/S/W Mutant	541 541 541	HLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNPECESE!YPDFVT!AKGFN!PAVRVTKKSEVRAA!K HLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNPECESE!YPDFVT!AKGFN!PAVRVTKKSEVRAA!K HLGMVVQLEDRFYKANRAHTYLGNPECESE!YPDFVT!AKGFN!PAVRVTKKSEVRAA!K HLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNPECESE!YPDFVT!AKGFN!PAVRVTKKSEVRAA!K HLGMVVQLEDRFYKANRAHTYLGNPECESE!YPDFVT!AKGFN!PAVRVTKKSEVRAA!K ***********************************	600 600 600 600
Wild P/R Mutant P/W Mutant P/S Mutant P/S/W Mutant	601 601	KMLETPGPYLLDIIVPHQEHVLPMIPSGGAFKDMILDGDGRTVY KMLETPGPYLLDIIVPHQEHVLPMIPSGGAFKDMILDGDGRTVY KMLETPGPYLLDIIVPHQEHVLPMIPSGGAFKDMILDGDGRTVY KMLETPGPYLLDIIVPHQEHVLPMIPIGGAFKDMILDGDGRTVY KMLETPGPYLLDIIVPHQEHVLPMIPIGGAFKDMILDGDGRTVY KMLETPGPYLLDIIVPHQEHVLPMIPIGGAFKDMILDGDGRTVY	644 644 644 644



図 2 A

Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	1 CCCAAACCCAGAAACCCTCGCCGCCGCCGCCGCCGCCACCACCACGATGGCTACGACCG 1 CCCAAACCCAGAAACCCTCGCCGCCGCCGCCGCCGCCACCACCACCATGGCTACGACCG 1 CCCAAACCCAGAAACCCTCGCCGCCGCCGCCGCCGCCACCACCACCATGGCTACGACCG 1 CCCAAACCCAGAAACCCTCGCCGCCGCCGCCGCCGCCACCACCCAC	60 60 60 60
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	61 CCGCGGCCGCGCCGCCCCTGTCCGCCGCGCGCGCCAAGACCGGCCATAAGAACC 61 CCGCGGCCGCGCGCCGCCCTGTCCGCCGCCGCGACGGCCAAGACCGGCCGTAAGAACC 61 CCGCGGCCGCGCGCCGCCTGTCCGCCGCGCGCGACGGCCAAGACCGGCCGTAAGAACC 61 CCGCGGCCGCGCCGCCCTGTCCGCCGCGCGCACGCCAAGACCGGCCGTAAGAACC 61 CCGCGGCCGCGCCGCCCCTGTCCGCCGCGCGACGGCCAAGACCGGCCGTAAGAACC 61 CCGCGGCCGCGCGCCGCCCTGTCCGCCGCGCGACGGCCAAGACCGGCCGTAAGAACC	120 120 120 120 120
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	121 ACCAGCGACACCACGTCCTTCCCGCTCGAGGCCGGGTGGGGGGGG	180 180 180 180 180
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	181 CGGCGGTGTCCCCGGTCACCCCGCCGTCCCCGGCGCCGCCGGCCACGCCGCTCCGGCCGT 181 CGGCGGTGTCCCCGGTCACCCCGCCGTCCCCGGCGCCGCCGCCACGCCGCTCCGGCCGT 181 CGGCGGTGTCCCCGGTCACCCCGCCGTCCCCGGCGCCGCCGCCACGCCGCTCCGGCCGT 181 CGGCGGTGTCCCCGGTCACCCCGCCGTCCCCGGCGCCACGCCACGCCGCTCCGGCCGT 181 CGGCGGTGTCCCCGGTCACCCCGCCGTCCCCGGCGCCACGCCACGCCGCTCCGGCCGT ***********************	240 240 240 240 240 240
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	241 GGGGGCCGACCCGCAAGGGCGCGGACATCCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGTGCG 241 GGGGCCGGCCGAGCCCCGCAAGGGCGCGGACATCCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGTGCG 241 GGGGCCGGCCGAGCCCCGCAAGGGCGCGGACATCCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGTGCG 241 GGGGCCGGCCGAGCCCCGCAAGGGCGCGGACATCCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGTGCG 241 GGGGCCGGCCGAGCCCCGCAAGGGCGCGGACATCCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGTGCG 241 GGGGCCGGCCGAGCCCCGCAAGGGCGCGGACATCCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGTGCG 241 GGGGGCCGGCCGAGCCCCGCAAGGGCGCGGACATCCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGTGCG	300 300 300 300 300
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	301 GCGTCAGCGACGTGTTCGCCTACCCGGGCGGCGCGCTCCATGGAGATCCACCAGGCGCTGA 301 GCGTCAGCGACGTGTTCGCCTACCCGGGCGGCGCTCCATGGAGATCCACCAGGCGCTGA 301 GCGTCAGCGACGTGTTCGCCTACCCGGGCGGCGCTCCATGGAGATCCACCAGGCGCTGA 301 GCGTCAGCGACGTGTTCGCCTACCCGGGCGGCGCTCCATGGAGATCCACCAGGCGCTGA 301 GCGTCAGCGACGTGTTCGCCTACCCGGGCGGCGCTCCATGGAGATCCACCAGGCGCTGA ************************************	360 360 360 360 360
'Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	361 CGCGCTCCCCGGTCATCACCAACCACCTCTTCCGCCACGAGCAGGCGAGGCGAGGCGTTCGCGG 361 CGCGCTCCCCGGTCATCACCAACCACCTCTTCCGCCACGAGCAGGCGAGGCGAGGCGTTCGCGG 361 CGCGCTCCCCGGTCATCACCAACCACCTCTTCCGCCACGAGCAGGCGAGGCGAGGCGTTCGCGG 361 CGCGCTCCCCGGTCATCACCAACCACCTCTTCCGCCACGAGCAGGCGAGGCGAGGCGTTCGCGG 361 CGCGCTCCCCGGTCATCACCAACCACCTCTTCCGCCACGAGCAGGCGAGGCGAGGCGTTCGCGG ****************************	420 420 420 420 420
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	421 CGTCCGGGTACGCGCGCGCGTCCGGCCGCGTCGGGGTCTGCGTCGCCACCTCCGGCCCCG 421 CGTCCGGGTACGCGCGCGCGTCCGGCGCGCGTCGGGGTCTGCGTCGCCACCTCCGGCCCCG 421 CGTCCGGGTACGCGCGCGTCCGGCCGCGTCGGGGTCTGCGTCGCCACCTCCGGCCCCG 421 CGTCCGGGTACGCGCGCGTCCGGCCCGCGTCGGGGTCTGCGTCGCCACCTCCGGCCCCG 421 CGTCCGGGTACGCGCGCGTCCGGCCCGCGTCGGGGTCTGCGTCGCCACCTCCGGCCCCG 421 CGTCCGGGTACGCGCGCGTCCGGCCCGCGTCGGGGTCTGCGTCGCCCACCTCCGGCCCCG 421 CGTCCGGGTACGCGCGCGTCCGGCCCGCGTCGGGTCTGCGTCGCCCACCTCCGGCCCCG	480 480 480 480 480
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	481 GGGCAACCACCTCGTGTCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTCGACTCCGTCCCGATGGTCG 481 GGGCAACCAACCTCGTGTCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTCGACTCCGTCCCGATGGTCG 481 GGGCAACCAACCTCGTGTCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTCGACTCCGTCCCGATGGTCG 481 GGGCAACCAACCTCGTGTCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTCGACTCCGTCCCGATGGTCG 481 GGGCAACCAACCTCGTGTCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTCGACTCCGTCCCGATGGTCG 481 GGGCAACCAACCTCGTGTCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTCGACTCCGATCGTCCCGATGGTCG	540 540 540 540 540
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	541 CCATCACGGGCCAGGTCCCCCGCCGCATGATCGGCACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCCA 541 CCATCACGGGCCAGGTCCACACGCCGCATGATCGGCACCCGACGCCTTCCAGGAGACGCCCA 541 CCATCACGGGCCAGGTCCACCGCCGCATGATCGGCACCGCCTTCCAGGAGACGCCCA 541 CCATCACGGGCCAGGTCCACCGCCGCATGATCGGCACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCCA 541 CCATCACGGGCCAGGTCCACCGCCGCATGATCGGCACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCCA 541 CCATCACGGGCCAGGTCCACCGCCGCATGATCGGCACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCCA 541 CCATCACGGGCCAGGTCCACCGCCGCATGATCGGCACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCCA	600 600 600 600
Wild P/R Mutation P/W Mutation	601 TAGTCGAGGTCACCCGCTCCATCACCAAGCACAATTACCTTGTCCTTGATGTGGAGGACA 601 TAGTCGAGGTCACCCGCTCCATCACCAAGCACAATTACCTTGTCCTTGATGTGGAGGACA 601 TAGTCGAGGTCACCCGCTCCATCACCAAGCACAATTACCTTGTCCTTGATGTGGAGGACA	660 660 660



図 2 B

P/S Mutation P/W/S Mutation		660 660
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	661 TCCCCCGCTCATACAGGAAGCCTTCTTCCTCGCGTCCTCGGGCCGTCCTGGCCCGGTGC 661 TCCCCCCGCGTCATACAGGAAGCCTTCTTCCTCGCGTCCTCGGGCCGTCCTGGCCCGGTGC 661 TCCCCCGCGTCATACAGGAAGCCTTCTTCCTCGCGTCCTCGGGCCGTCCTGGCCCGGTGC 661 TCCCCCGCGTCATACAGGAAGCCTTCTTCCTCGCGTCCTCGGGCCGTCCTGGCCCGGTGC	720 720 720 720 720 720
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	721 TGGTCGACATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGCAGCTGGCCGGTGCCGGTCTGGGACACCTCGA 721 TGGTCGACATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGCAGCTGGCCGTGCCGGTCTGGGACACCTCGA 721 TGGTCGACATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGCAGCAGCTGGCCGTGCCGGTCTGGGACACCTCGA	780 780 780 780 780 780
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	781 TGAATCTACCAGGGTACATCGCACGCCTGCCCAAGCCACGCGGACAGAATTGCTTGAGC 781 TGAATCTACCAGGGTACATCGCACGCCTGCCCAAGCCACGCGGACAGAATTGCTTGAGC 781 TGAATCTACCAGGGTACATCGCACGCCTGCCCAAGCCACCCGCGACAGAATTGCTTGAGC	840 840 840 840 840
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	841 AGGTCTTGCGTCTGGGTTGGCGAGTCACGGCGCCCGATTCTCTATGTCGGTGGTGGCTGCT 841 AGGTCTTGCGTCTGGTTGGCGAGTCACGGCGCCCGATTCTCTATGTCGGTGGTGGCTGCT 841 AGGTCTTGCGTCTGGTTGGCGAGTCACGGCGCCCGATTCTCTATGTCGGTGGTGGCTGCT	900 900 900 900 900
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	901 CTGCATCTGGTGACGAATTGCGCTGGTTTGTTGAGCTGACTGGTATCCCAGTTACAACCA 901 CTGCATCTGGTGACGAATTGCGCTGGTTTGTTGAGCTGACTGGTATCCCAGTTACAACCA 901 CTGCATCTGGTGACGAATTGCGCTGGTTTGTTGAGCTGACTGGTATCCCAGTTACAACCA	960 960 960 960 960
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	961 CTCTGATGGGCCTCGGCAATTTCCCCAGTGACGACCCGTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGA 1 961 CTCTGATGGGCCTCGGCAATTTCCCCAGTGACGACCCGTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGA 1 961 CTCTGATGGGCCTCGGCAATTTCCCCAGTGACGACCCGTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGA 1	020 020 020 020 020 020
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	1021 IGCATGCACGGTGTACGCAAATTATGCCGTGGATAAGGCTGACCTGTTGCTTGC	080 080 080 080 080
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	1081 GTGTGCGGTTTGATGATCGTGTGACAGGGAAAATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCCAAGA 1 1081 GTGTGCGGTTTGATGATCGTGTGACAGGGAAAATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCCAAGA 1 1081 GTGTGCGGTTTGATGATCGTGTGACAGGGAAAATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCCAAGA 1	140 140 140 140 140
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	1141 TIGTGCACATTGACATTGATCCAGCAGAGATTGGAAAGAACAAGCAACCACATGTGTCAA 1 1141 TIGTGCACATTGACATTGATCCAGCAGAGATTGGAAAGAACAAGCAACCACATGTGTCAA 1 1141 TIGTGCACATTGACATTGATCCAGCAGAGATTGGAAAGAACAAGCAACCACATGTGTCAA 1 1141 TIGTGCACATTGACATTGATCCAGCAGAGATTGGAAAGAACAAGCAACCACATGTGTCAA 1	200 200 200 200 200 200
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	1201 TTTGCGCAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTACAACAGAGCACAA 1201 TTTGCGCAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTACAACAGAGCACAA 1201 TTTGCGCAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTACAACAGAGCACAA 1201 TTTGCGCAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTACAACAGAGCACAA	1260 1260 1260 1260 1260
Wild P/R Mutation	1261 CAAACACAACTTCTGATTTTAGTGCATGGCACAATGAGTTGGACCAGCAGAAGAGGGGAGT 1	1320 1320



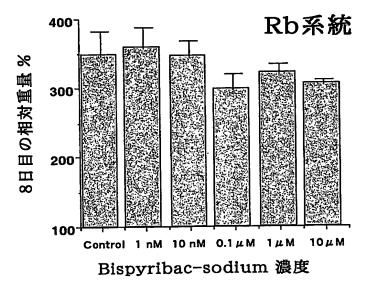
図2 C

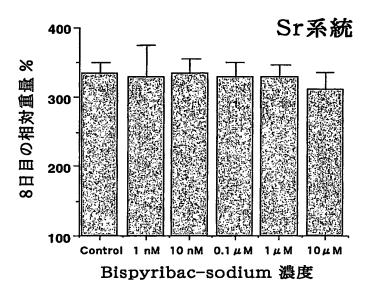
		凶とし	
P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	1261	CAAAGACAAGTTCTGATTTTAGTGCATGGCACAATGAGTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGT CAAAGACAAGTTCTGATTTTAGTGCATGGCACAATGAGTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGT CAAAGACAAGTTCTGATTTTAGTGCATGGCACAATGAGTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGT CAAAGACAAGTTCTGATTTTAGTGCATGACAATGAGTTGGACCAGCAGAAGAGAGAG	1320 1320 1320
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	1321] 1321] 1321]	TTCCTCTGGGGTACAAAACTTTTGGTGAAGAGATCCCACCGCAATATGCCATTCAGGTGC TTCCTCTGGGGTACAAAACTTTTGGTGAAGAGATCCCACCGCAATATGCCATTCAGGTGC TTCCTCTGGGGTACAAAACTTTTGGTGAAGAGATCCCACCGCAATATGCCATTCAGGTGC TTCCTCTGGGGTACAAAACTTTTGGTGAAGAGATCCCACCGCAATATGCCATTCAGGTGC TTCCTCTGGGGTACAAAACTTTTGGTGAAGAGATCCCACCGCAATATGCCATTCAGGTGC TTCCTCTGGGGTACAAAACTTTTGGTGAAGAGATCCCACCGCAATATGCCATTCAGGTGC	1380 1380 1380 1380 1380
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	1381 1381 1381	TGGATGAGCTGACGAAAGGTGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTTGGGCAGCACCAGATGT TGGATGAGCTGACGAAAGGTGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTTTGGGCAGCACCAGATGT TGGATGAGCTGACGAAAGGTGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTTGGGCAGCACCAGATGT TGGATGAGCTGACGAAAGGTGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTTGGGCAGCACCAGATGT TGGATGAGCTGACGAAAGGTGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTTGGGCAGCACCAGATGT TGGATGAGCTGACGAAAGGTGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTTGGGCAGCACCACAGATGT	1440 1440 1440 1440 1440
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	1441 1441 1441	GGGCGGCACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTCTGG GGGCGGCACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTCTGG GGGCGCACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTCTGG GGGCGGCACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTCTGG GGGCGGCACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTCTGG GGGCGGCACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCCGGCTGGTCTGG ***************	1500 1500 1500 1500 1500
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	1501 1501 1501	GCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCAGCTGGTGCTTCTGTGGCTAACCCAGGTGTCA GCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCAGCTGGTGCTTCTGTGGCTAACCCAGGTGTCA GCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGCAGCTGGTGCTTCTGTGGCTAACCCAGGTGTCA GCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGCAGCTGGTGCTTCTGTGGCTAACCCAGGTGTCA GCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGCAGCTGGTGCTTCTGTGGCTAACCCAGGTGTCA ************************************	1560 1560 1560 1560 1560
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	1561 1561 1561	CAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTCCTCATGAACATTCAGGAGCTGGCATTGA CAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTCCTCATGAACATTCAGGAGCTGGCATTGA CAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTCCTCATGAACATTCAGGAGCTGGCATTGA CAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTCCTCATGAACATTCAGGAGCTGGCATTGA CAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTCCTCATGAACATTCAGGAGCTGGCATTGA **********************************	1620 1620 1620 1620 1620
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	1621 1621	TCCGCATTGAGAACCTCCCTGTGAAGGTGATGGTGTTGAACAACCAAC	1680 1680 1680 1680 1680
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation P/W/S Mutation	1681 1681 1681 1681 1681	TGGTGCAATGGGAGGATAGGTTTTACAAGGCGAATAGGGCGCATACATA	1740 1740 1740 1740 1740
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	1741 1741 1741 1741 1741	CGGAATGTGAGAGCGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAGGGGTTCAATATTC CGGAATGTGAGAGCGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAGGGGTTCAATATTC	1800 1800 1800 1800 1800
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	1801 1801 1801		1860 1860 1860 1860 1860
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutatior	1861 1861 1861	CTCCAGGGCCATACTTGTTGGATATCATCGTCCCGCACCAGGAGCATGTGCTGCCTATGA CTCCAGGGCCATACTTGTTGGATATCATCGTCCCGCACCAGGAGCATGTGCTGCTATGA CTCCAGGGCCATACTTGTTGGATATCATCGTCCCGCACCAGGAGCATGTGCTGCCTATGA CTCCAGGGCCATACTTGTTGGATATCATCGTCCCGCACCAGGAGCATGTGCTGCCTATGA CTCCAGGGCCATACTTGTTGGATATCATCGTCCCGCACCAGGAGCATGTGCTGCCTATGA	1920 1920 1920 1920 1920
Wild	1921	TCCCAAGTGGGGGCGCATTCAAGGACATGATCCTGGATGGTGATGGCAGGACTGTGTATT	1980

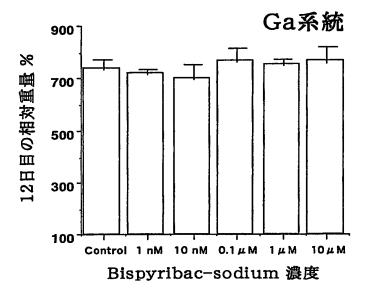


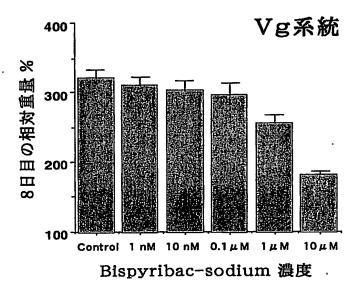
図2D

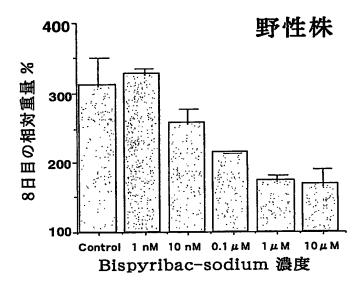
P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	1921 TCCCAAGTGGGGGCGCATTCAAGGACATGATCCTGGATGGTGATGGCAGGACTGTGTATT 1921 TCCCAAGTGGGGGCGCATTCAAGGACATGATCCTGGATGGTGATGGCAGGACTGTGTATT 1921 TCCCAATTGGGGGCGCATTCAAGGACATGATCCTGGATGGTGATGGCAGGACTGTGTATT 1921 TCCCAATTGGGGGCGCATTCAAGGACATGATCCTGGATGGTGATGGCAGGACTGTGTATT *******************************	1980 1980 1980
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	1981 AATCTATAATCTGTATGTTGGCAAAGCACCAGCCCGGCCTATGTTTGACCTGAATGACCC 1981 AATCTATAATCTGTATGTTGGCAAAGCACCAGCCCGGCCTATGTTTGACCTGAATGACCC 1981 AATCTATAATCTGTATGTTGGCAAAGCACCAGCCCGGCCTATGTTTGACCTGAATGACCC 1981 AATCTATAATCTGTATGTTGGCAAAGCACCAGCCCGGCCTATGTTTGACCTGAATGACCC 1981 AATCTATAATCTGTATGTTGGCAAAGCACCAGCCCGGCCTATGTTTGACCTGAATGACCC 1981 AATCTATAATCTGTATGTTGGCAAAGCACCAGCCCGGCCTATGTTTGACCTGAATGACCC **********************************	2040 2040 2040 2040 2040
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	2041 ATAAAGAGTGGTATGCCTATGATGTTTGTATGTGCTCTATCAATAACTAAGGTGTCAACT 2041 ATAAAGAGTGGTATGCCTATGATGTTTGTATGTGCTCTATCAATAACTAAGGTGTCAACT 2041 ATAAAGAGTGGTATGCCTATGATGTTTGTATGTGCTCTATCAATAACTAAGGTGTCAACT 2041 ATAAAGAGTGGTATGCCTATGATGTTTGTATGTGCTCTATCAATAACTAAGGTGTCAACT 2041 ATAAAGAGTGGTATGCCTATGATGTTTGTATGTGCTCTATCAATAACTAAGGTGTCAACT	2100 2100 2100 2100
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	2101 ATGAACCATATGCTCTTCTGTTTTACTTGTTTGATGTCTTGGCATGGTAATCCTAATTA 2101 ATGAACCATATGCTCTTCTGTTTTACTTGTTTGATGTCTTGGCATGGTAATCCTAATTA 2101 ATGAACCATATGCTCTTCTGTTTTACTTGTTTGATGTCTTGGCATGGTAATCCTAATTA 2101 ATGAACCATATGCTCTTCTGTTTTACTTGTTTGATGTCTTGGCATGGTAATCCTAATTA 2101 ATGAACCATATGCTCTTCTGTTTTACTTGTTTGATGTCTTGGCATGGTAATCCTAATTA ***************************	2160 2160 2160 2160
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	2161 GCTTCCTGCTGTCTAGGTTTGTAGTGTGTTGTTTTCTGTAGGCATATGCATCACAAGATA 2161 GCTTCCTGCTGTCTAGGTTTGTAGTGTGTTTTTCTGTAGGCATATGCATCACAAGATA 2161 GCTTCCTGCTGTCTAGGTTTGTAGTGTTGTTTTTCTGTAGGCATATGCATCACAAGATA 2161 GCTTCCTGCTGTCTAGGTTTGTAGTGTGTTGTTTTTCTGTAGGCATATGCATCACAAGATA 2161 GCTTCCTGCTGTCTAGGTTTGTAGTGTTGTTTTTCTGTAGGCATATGCATCACAAGATA *********************************	2220 2220 2220
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	2221 TCATGTAAGTTTCTTGTCCTACATATCAATAATAAGAGAATAAAGTACTTCTATGCAAAA 2221 TCATGTAAGTTTCTTGTCCTACATATCAATAATAAGAGAATAAAGTACTTCTATGCAAAA 2221 TCATGTAAGTTTCTTGTCCTACATATCAATAATAAGAGAATAAAGTACTTCTATGCAAAA 2221 TCATGTAAGTTTCTTGTCCTACATATCAATAATAAGAGAATAAAGTACTTCTATGTAAAA 2221 TCATGTAAGTTTCTTGTCCTACATATCAATAATAAGAGAATAAAGTACTTCTATGTAAAA ******************************	2280 2280 2280 2280 2280 2280
Wild P/R Mutation P/W Mutation P/S Mutation P/W/S Mutation	2281 AAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2281 AAAAAAAAAAAAAAAAA 2281 AAAAAAAAAAAAAAAA 2281 AAAAAAAAAAAAAA 2281 AAAAAAAAAAAAA 2281 AAAAAAAAAAAAA 2281 AAAAAAAAAAAA	2301 2301 2300 2294 2294

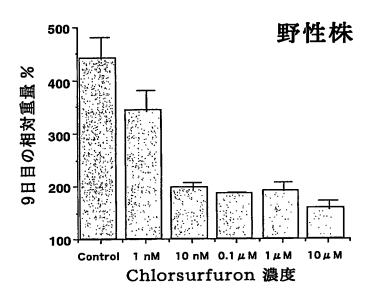




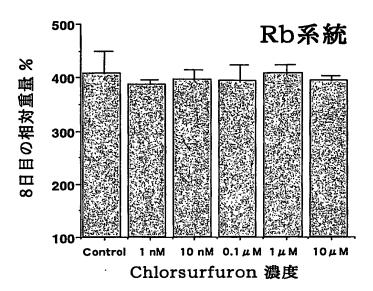














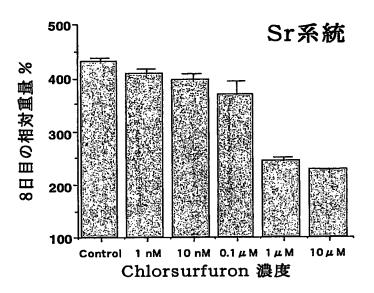




図11

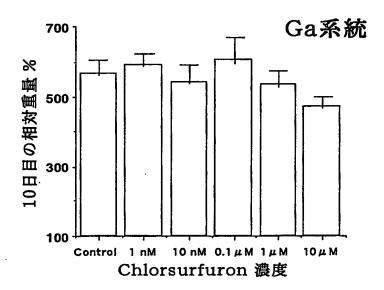
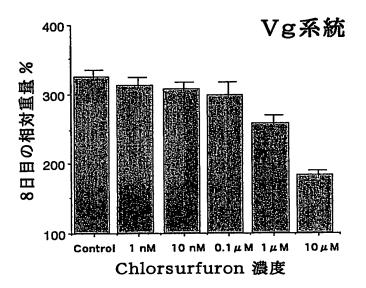




図12



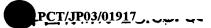
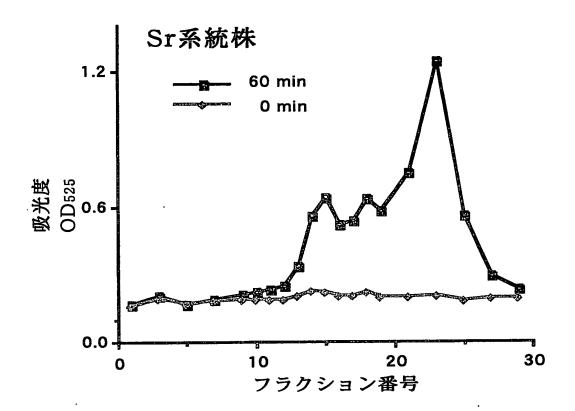
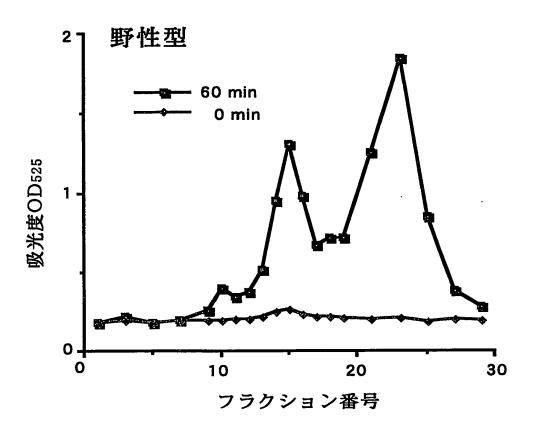


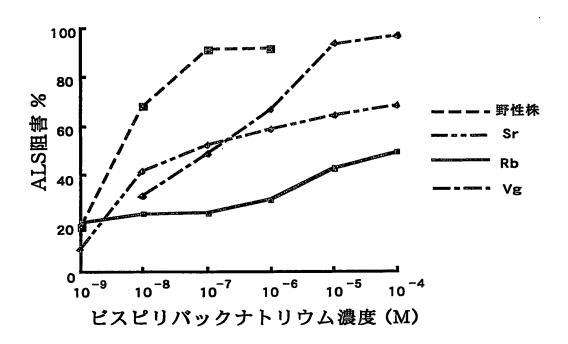
図13



17/34

図14





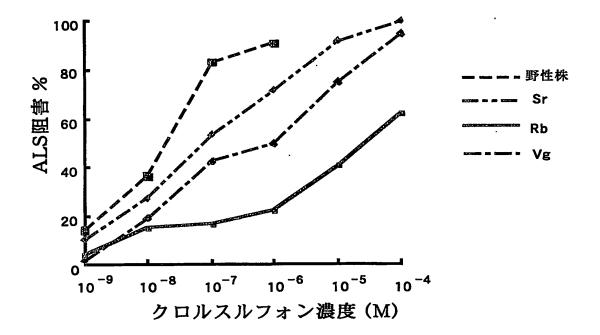


図17

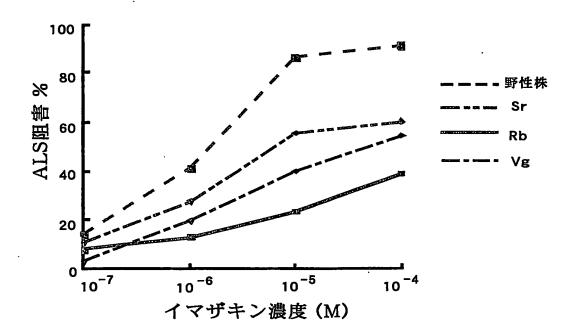




図18A

1st Nucleotide Sequence File Name : Nipponbare ALS partial cDNA Sequence Size : 1505

2nd Nucleotide Sequence File Name : X63554 maize ALS 1 Sequence Size : 2544

Seque	ICE 31ZE • Z074
1'	ACCCACGCGTCCGATGTGGAGGA ** ** ** **
1141"	CATCGTCGAGGTCACCCGCTCCATCACCAAGCACAACTACCTGGTCCTCGACGTCGACGA
24'	CATCCCCCGCGTCATACAGGAAGCCTTCTTCCTCGCGCTCCTCGGGCCGGTCCTGGCCCGGT
1201″	********* * ***** ************ ** ** **
84'	GCTGGTCGACATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGATGGCCGTGCCGGTCTGGGACACCTC *** *******************************
1261"	GCTTGTTGACATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGATGGCGGTGCCGGCCTGGGACACGCC
144'	GATGAATCTACCAGGGTACATCGCACGCCTGCCCAAGCCACCCGCGACAGAATTGCTTGA **** *** ** *************************
1321″	CATGAGTCTGCCTGGGTACATCGCGCGCCCTTCCCAAGCCTCCCGCGACTGAATTTCTTGA
204'	GCAGGTCTTGCGTCGGTGGCGAGTCACGGCGCCCGATTCTCTATGTCGGTGGTGGCTG
	GCAGGTGCTGCTCTTGTTGGTGAATCACGGCGCCCTGTTCTTTATGTTGGCGGTGGCTG
264'	CTCTGCATCTGGTGACGAATTGCGCTGGTTTGTTGAGCTGACTGGTATCCCAGTTACAAC * ***** ****** ****** ******* ******* ****
1441″	TGCAGCATCAGGTGAGGAGTTGTGCCGCTTTGTGGAGTTGACTGGAATCCCAGTCACAAC
324'	CACTCTGATGGCCTCGGCAATTTCCCCAGTGACGACCCGTTGTCCCTGCGCATGCTTGG
1501″	TACTCTTATGGGCCTTGGCAACTTCCCCAGCGACGACCACTGTCACTGCGCATGCTTGG
384'	GATGCATGGCACGGTGTACGCAAATTATGCCGTGGATAAGGCTGACCTGTTGCTTGC
1561″	TATGCATGGCACAGTGTATGCAAATTATGCAGTGGATAAGGCCGATCTGTTGCTTGC
444'	TGGTGTGCGGTTTGATGATCGTGTGACAGGGAAAATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCCAA
1621"	TGGTGTGCGGTTTGATGATCGTGTGACAGGGAAAATTGAGGCTTTTGCAGGCAG
504'	GATTGTGCACATTGACATTGATCCAGCAGAGATTGGAAAGAACAAGCAACCACATGTGTC *********************************
1681″	GATTGTGCACATTGATATTGATCCTGCTGAGATTGGCAAGAACAAGCAGCCACATGTGTC
564'	AATTTGCGCAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTACAACAGAGCAC ** ** ******************************
1741″	CATCTGTGCAGATGTTAAGCTTGCTTTGCAGGGCATGAATACTCTTCTGGAAGGAA
624'	AACAAAGACAAGTTCTGATTTTAGTGCATGGCACAATGAGTTGGACCAGCAGAAGAGGGA * ****** ** * *** * * ******* ***** ****
1801"	ATCAAAGAAGAGCTTTGACTTCGGCTCATGGCATGATGAATTGGATCAGCAAAAGAGGGA
684'	GTTTCCTCTGGGGTACAAAACTTTTGGTGAAGAGATCCCACCGCAATATGCCATTCAGGT
1861"	
744'	GCTGGATGAGCTGACGAAAGGTGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTTGGGCAGCACCAGAT
1921"	** ***** ***** ** ***** ** ***** ** **
804'	GTGGGCGCACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTCT
1981″	********* ****** ******* *************
864'	GGGCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGCAGCTGGTGCTTCTGTGGCTAACCCAGGTGT
2041"	** ** ******* **** **** ***** ****** ****
924'	CACAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTCCTCATGAACATTCAGGAGCTGGCATT *** ****** ** ** ** ***************



図18B

2101"	CACTGTTGTTGACATCGACGGAGATGGTAGCTTCCTCATGAACATTCAGGAGCTAGCT
984'	GATCCGCATTGAGAACCTCCCTGTGAAGGTGATGGTGTTGAACAACCAAC
2161″	GATCCGTATTGAGAACCTCCCAGTCAAGGTCTTTGTGCTAAACAACCAGGACCTCGGGAT
1044'	GGTGGTGCAATGGGAGGATAGGTTTTACAAGGCGAATAGGGCGCATACATA
2221″	GGTGGTGCAGTGGGAGGACAGGTTCTATAAGGCCAATAGAGCACACACA
1104'	CCCGGAATGTGAGAGCGAGATATATCCAGATTTTGTGACCTATTGCTAAGGGGTTCAATA
2281"	*** ** ** ** *************************
1164	TTCCTGCAGTCCGTGTAACAAAGAAGATGAAGTCCGTGCCGCCATCAAGAAGATGCTCG
2340″	
1224'	AGACTCCAGGGCCATACTTGTTGGATATCATCGTCCCGCACCAGGAGCATGTGCTGCTA
2400~	AGGCTCCAGGGCCGTACCTCTTGGATATAATCGTCCCGCACCAGGAGCATGTGTTGCCTA
1284	TGATCCCAAGTGGGGGCGCATTCAAGGACATGATCCTGGATGGTGATGGCAGGACTGTGT
2460″	TGATCCCTAGTGGTGGGGCTTTCAAGGATATGATCCTGGATGGTGATGGCAGGACTGTGT
1344'	ATTAATCTATAATCTGTATGTTGGCAAAGCACCAGCCCGGCCTATGTTTGACCTGAATGA
2520"	ATTGATCCGTTGACTGCAGGTCGAC



図19A

1st Nucleotide Sequence File Name : 2点変異型完全長 ALS cDNA 2nd Nucleotide Sequence File Name : 野性型完全長 ALS cDNA

1'	CTCGCCGCCGCCGCCGCCACCACCACCATGGCTACGACCG
1″	CCCAAACCCAGAAACCCTCGCCGCCGCCGCCGCCGCCACCACCACCATGGCTACGACCG
45'	CGGCGGCGGCGGCGCCGCCTGTCCGCCGCGGACGGCCAAGACCGGCCGTAAGAACC
61″	CCGCGGCCGCCGCCCTGTCCGCCGCCGCGACGGCCAAGACCGGCCGTAAGAACC
105'	ACCAGCGACACCACGTCCTTCCCGCTCGAGGCCGGGTGGGGGGGG
121"	ACCAGCGACACCACGTCCTTCCCGCTCGAGGCCGGGTGGGGGGGG
165'	CGGCGGTGTCCCCGGTCACCCGCCGTCCCCGGCGCCGCCGCCACGCCGCTCCGGCCGT
181″	CGGCGGTGTCCCCGGTCACCCCGCCGTCCCCGGCGCCGCCGGCCACGCCGCTCCGGCCGT
225'	GGGGCCGGCCGAGCCCCGCAAGGCCCGGACATCCTCGTGGAGCGCTGGAGCGGTGCG
241″	GGGGGCCGGCCGAGCCCCGCAAGGGCGCGGACATCCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGTGCG
285'	GCGTCAGCGACGTGTTCGCCTACCCGGGCGGCGCGCTCCATGGAGATCCACCAGGCGCTGA
301″	GCGTCAGCGACGTGTTCGCCTACCCGGGCGCGCGCCGTCCATGGAGATCCACCAGGCGCTGA
345'	CGCGCTCCCCGGTCATCACCACCACCTCTTCCGCCACGAGCAGGGCGAGGCGTTCGCGG
361″	CGCGCTCCCCGGTCATCACCAACCACCTCTTCCGCCACGAGCAGGCGAGGCGATCGCGG
405'	CGTCCGGGTACGCGCGCGCGTCCGGCGTCGGGGTCTGCGTCGCCACCTCCGGCCCCG
421″	

481~	GGGCAACCAACCTCGTGTCCGCGCTCGCCGACGCGCTCGCT
525'	CCATCACGGGCCAGGTCCCCCGCGCATGATCGGCACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCCA
541"	CCATCACGGGCCAGGTCCCCCGCCGCATGATCGGCACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCCA TAGTCGAGGTCACCCGCTCCATCACCAAGCACAATTACCTTGTCCTTGATGTGGAGGACA
585' 601 <i>"</i>	***
645'	TCCCCCGCGTCATACAGGAAGCCTTCTTCCTCGCGTCCTCGGGCCGTCCTGGCCCGGTGC
661"	**************************************
705'	TGGTCGACATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGATGGCCGTGCCGGTCTGGGACACCTCGA
721"	**************************************
765'	TGAATCTACCAGGGTACATCGCACGCCTGCCCAAGCCACCCGCGACAGAATTGCTTGAGC
781″	**************************************
825'	AGGTCTTGCGTCTGGTTGGCGAGTCACGGCGCCCGATTCTCTATGTCGGTGGTGGTGGCTGCT
841"	**************************************
885'	CTGCATCTGGTGACGAATTGCGCTGGTTTGTTGAGCTGACTGGTATCCCAGTTACAACCA
901″	**************************************
945'	CTCTGATGGGCCTCGGCAATTTCCCCAGTGACGACCCGTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGA
961"	**************************************
1005'	TGCATGGCACGGTGTACGCAAATTATGCCGTGGATAAGGCTGACCTGTTGCTTTGCGTTTG



図19B

1021″	TGCATGGCACGGTGTACGCAAATTATGCCGTGGATAAGGCTGACCTGTTGCTTGC
1065'	GTGTGCGGTTTGATGATCGTGTGACAGGGAAAATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCCAAGA
1081″	GTGTGCGGTTTGATGATCGTGTGACAGGGAAAATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCCAAGA
1125'	TTGTGCACATTGACATTGATCCAGCAGAGATTGGAAAGAACAAGCAACCACGTGTGCAA
1141″	TTGTGCACATTGACATTGATCCAGCAGAGAATTGGAAAGAACAAGCAACCACATGTGTCAA
1185'	TTTGCGCAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTACAACAGAGCACAA
1201″	TTTGCGCAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTACAACAGAGCACAA
1245'	CAAAGACAAGTTCTGATTTTAGTGCATGGCACAATGAGTTGGACCAGCAGAAGAGGGGAGT
1261~	CAAAGACAAGTTCTGATTTTAGTGCATGGCACAATGAGTTGGACCAGCAGAAGAGGGGAGT
1305'	TTCCTCTGGGGTACAAAACTTTTGGTGAAGAGATCCCACCGCAATATGCCATTCAGGTGC
1321~	TTCCTCTGGGGTACAAAACTTTTGGTGAAGAGATCCCACCGCAATATGCCATTCAGGTGC
1365'	TGGATGAGCTGACGAAAGGTGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTTGGGCAGCACCAGATGT
1381″	TGGATGAGCTGACGAAAGGTGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTTGGGCAGCACCAGATGT
1425'	GGGCGGCACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTCTGG
1441"	GGGCGGCACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTCTGG GCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGCAGCTGGTGCTTCTGTGGCTAACCCAGGTGTCA
1485'	GCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGCAGCTGGTGCTTCTGTGGCTAACCCAGGTGTCA GCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGCAGCTGGTGCTTCTGTGGCTAACCCAGGTGTCA
1501" 1545'	CAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTCCTCATGAACATTCAGGAGCTGGCATTGA
1561"	CAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTCCTCATGAACATTCAGGAGCTGGCATTGA
1605'	TCCCCATTGAGAACCTCCCTGTGAAGGTGATGGTGTTGAACAACCAAC
1621"	**************************************
1665'	TGGTGCAATTGGAGGATAGGTTTTACAAGGCGAATAGGGCGCATACATA
1681″	******** *****************************
1725'	CGGAATGTGAGAGCGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAGGGGTTCAATATTC
1741″	CGGAATGTGAGAGCGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAGGGGTTGAATATTG
1785'	CTGCAGTCCGTGTAACAAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAGAAGATGCTCGAGA
1801″	CTGCAGTCCGTGTAACAAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAGAAGATGCTCGAGA
1845'	CTCCAGGGCCATACTTGTTGGATATCATCGTCCCGCACCAGGAGCATGTGCTGCCTATGA
1861″	CTCCAGGGCCATACTTGTTGGATATCATCGTCCCGCACCAGGAGCATGTGCIGCCIAIGA
1905'	TCCCAATTGGGGGCGCATTCAAGGACATGATCCTGGATGGTGATGGCAGGACTGTGTATT
1921″	TCCCAAGTGGGGGCGCATTCAAGGACATGATCCTGGATGGTGATGGCAGGACTGTATT
1965'	AATCTATAATCTGTATGTTGGCAAAGCACCAGCCCGGCCTATGTTTGACCTGAATGACCC
1981″	AATCTATAATCTGTATGTTGGGAAAGCACCAGCCCGGCCTATGTTTGACCTGAATGACCC
2025'	ATAAAGAGTGGTATGCCTATGATGTTTGTATGTGCTCTATCAATAACTAAGGTGTCAACT
	ATAAAGAGTGGTATGCCTATGATGTTTGTATGTGCTCTATCAATAACTAAGGTGTCAACT
2085'	ATGAACCATATGCTCTTCTGTTTTACTTGTTTGATGTGCTTGGCATGGTAATCAATTA
	ATGAACCATATGCTCTTCTGTTTTACTTGTTTGATGTGCTTGGCATGGTAATCCTAATTA
2145'	GCTTCCTGCTGTCTAGGTTTGTAGTGTTTTTTTTTTTTT



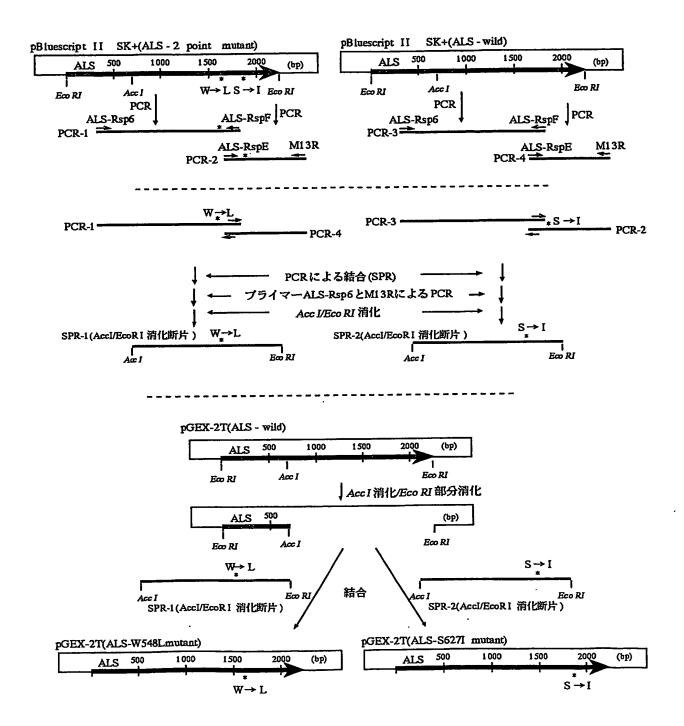
図19C

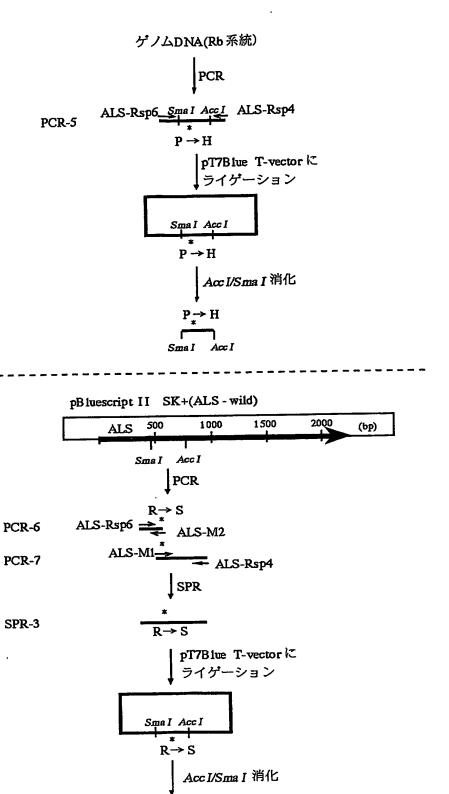
2161" GCTTCCTGCTGTCTAGGTTTGTAGTGTGTTTTTCTGTAGGCATATGCATCACAAGATA

2265' AAAAAAAAAAAAAAA

2281" AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA







 $R \xrightarrow{*} S$

SmaI A∝I

図 2 2

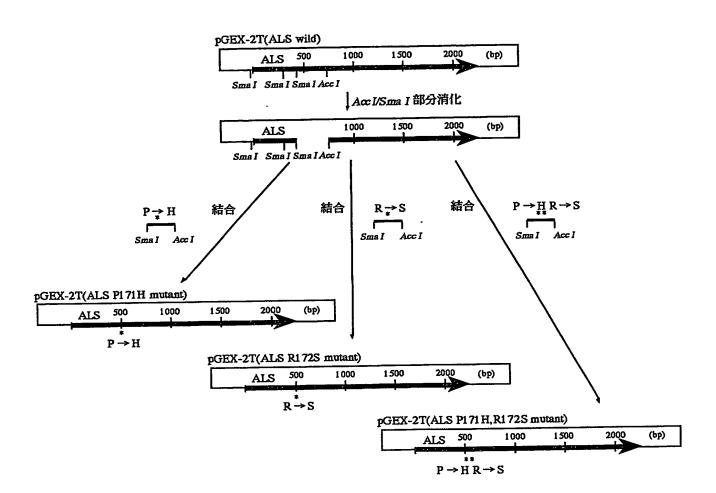
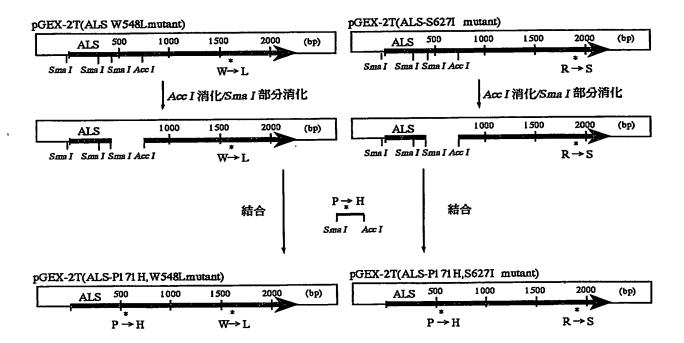




図 2 4





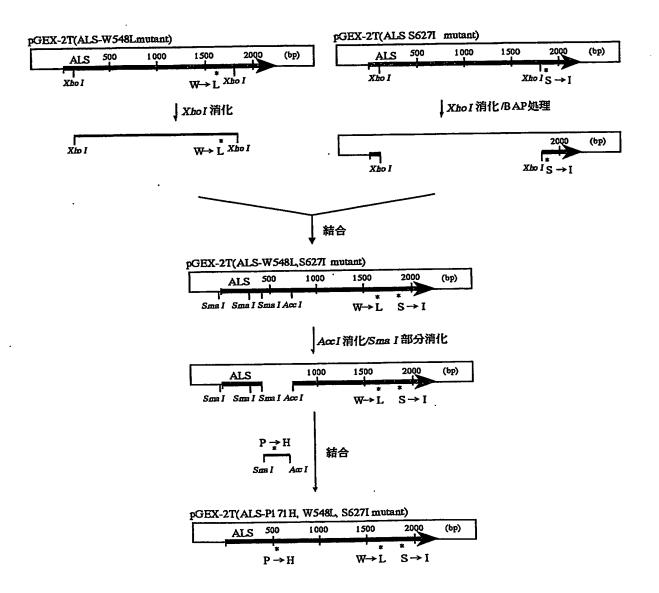
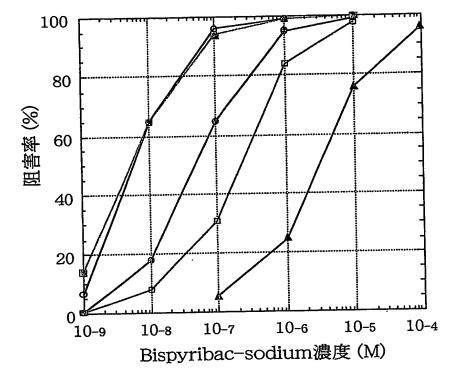
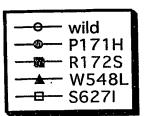
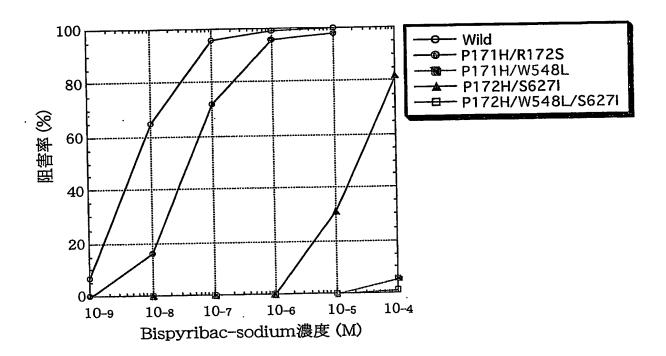


図26











SEQUENCE LISTING

- <110> KUMIAI CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD

 National Institute of Agrobiological Sciences
- <120> A gene coding for aceto-lactate-sythetase
- <130> PH-1733-PCT
- <150> JP 2002-95721
- <151> 2002-03-29
- <160> 34
- <170> PatentIn Ver. 2.0
- <210> 1
- <211> 2301
- <212> DNA
- <213> Oryza sativa var. kinmaze
- <220>
- <221> CDS
- <222> (48).. (1979)
- <400> 1

cccaaaccca gaaaccctcg ccgccgccgc cgccgccacc acccacc atg gct acg 56

Met Ala Thr

acc	gcc	gcg	gcc	gcg	gcc	gcc	gcc	ctg	tcc	gcc	gcc	gcg	acg	gcc	aag	104
Thr	Ala	Leu	Ser	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Lys							
	5					10					15					
	i															
acc	ggc	cgt	aag	aac	cac	cag	cga	cac	cac	gtc	ctt	ccc	gct	cga	ggc	152
Thr	Gly	Arg	Lys	Asn	His	Gln	Arg	His	His	Val	Leu	Pro	Ala	Arg	Gly	
20					25					30					35	
cgg	gtg	ggg	gcg	gcg	gcg	gtc	agg	tgc	tcg	gcg	gtg	tcc	ccg	gtc	acc	200
Arg	Val	Gly	Ala	Ala	Ala	Val	Arg	Cys	Ser	Ala	Va1	Ser	Pro	Val	Thr	
				40					45					50		
									ccg							248
Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Thr	Pro	Leu	Arg	Pro		Gly	Pro	
			55					60					65			
																000
									ctc							296
Ala	Glu		Arg	Lys	Gly	Ala		Ile	Leu	Val	Glu		Leu	Glu	Arg	
		70					75					80				
													.		~~~	344
									ccg							344
Cys		Val	Ser	Asp	Val		Ala	lyr	Pro	Gly			Ser	Mer	Glu	
	85					90					95					
										_ 4 _				o t c	++0	392
															ttc Pho	J J Z
		Gln	Ala	Leu			ser	rro	val			ASN	nis	T-CU	Phe 115	
100					105					110					110	



cgc	cac	gag	cag	ggc	gag	gcg	ttc	gcg	gcg	tcc	ggg	tac	gcg	cgc	gcg	440
Arg	His	Glu	Gln	Gly	Glu	Ala	Phe	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Arg	Ala	
				120					125					130		
tcc	ggc	cgc	gtc	ggg	gtc	tgc	gtc	gcc	acc	tcc	ggc	ссс	ggg	gca	acc	488
Ser	G1y	Arg	Val	Gly	Val	Cys	Val	Ala	Thr	Ser	Gly	Pro	Gly	Ala	Thr	
			135					140					145			
aac	ctc	gtg	tcc	gcg	ctc	gcc	gac	gcg	ctg	ctc	gac	tcc	gtc	ccg	atg	536
Asn	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Ala	Asp	Ala	Leu	Leu	Asp	Ser	Val	Pro	Met	
		150					155					160				
gtc	gcc	atc	acg	ggc	cag	gtc	cac	agc	cgc	atg	atc	ggc	acc	gac	gcc	584
Val	Ala	Ile	Thr	Gly	Gln	Val	His	Ser	Arg	Met	Ile	Gly	Thr	Asp	Ala	
	165					170					175					
ttc	cag	gag	acg	ccc	ata	gtc	gag	gtc	acc	cgc	tcc	atc	acc	aag	cac	632
Phe	Gln	Glu	Thr	Pro	Ile	Val	Glu	Val	Thr	Arg	Ser	Ile	Thr	Lys	His	
180					185					190					195	
aat	tac	ctt	gtc	ctt	gat	gtg	gag	gac	atc	ccc	cgc	gtc	ata	cag	gaa	680
Asn	Tyr	Leu	Val	Leu	Asp	Val	Glu	Asp	Ile	Pro	Arg	Val	Ile	G1n	Glu	
				200					205					210		
gcc	ttc	ttc	ctc	gcg	tcc	tcg	ggc	cgt	cct	ggc	ccg	gtg	ctg	gtc	gaċ	728
Ala	Phe	Phe	Leu	Ala	Ser	Ser	Gly	Arg	Pro	Gly	Pro	Val	Leu	Val	Asp	
			215					220					225			
atc	ccc	aag	gac	atc	cag	cag	cag	atg	gcc	gtg	ccg	gtc	tgg	gac	acc	776

3/56

WO 03/083118



Ile Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Met Ala Val Pro Val Trp Asp Thr 240 230 235 tcg atg aat cta cca ggg tac atc gca cgc ctg ccc aag cca ccc gcg 824 Ser Met Asn Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Pro Lys Pro Pro Ala 255 250 245 aca gaa ttg ctt gag cag gtc ttg cgt ctg gtt ggc gag tca cgg cgc 872 Thr Glu Leu Ceu Glu Gln Val Leu Arg Leu Val Gly Glu Ser Arg Arg 275 270 260 265 ccg att ctc tat gtc ggt ggt ggc tgc tct gca tct ggt gac gaa ttg 920 Pro Ile Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Ser Ala Ser Gly Asp Glu Leu 290 285 280 cgc tgg ttt gtt gag ctg act ggt atc cca gtt aca acc act ctg atg 968 Arg Trp Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Thr Thr Thr Leu Met 305 300 295 ggc ctc ggc aat ttc ccc agt gac gac ccg ttg tcc ctg cgc atg ctt 1016 Gly Leu Gly Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro Leu Ser Leu Arg Met Leu 320 315 310 ggg atg cat ggc acg gtg tac gca aat tat gcc gtg gat aag gct gac

ggg atg cat ggc acg gtg tac gca aat tat gcc gtg gat aag gct gac 1064
Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ala Asp
325 330 335

ctg ttg ctt gcg ttt ggt gtg cgg ttt gat gat cgt gtg aca ggg aaa 1112 Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys 4/56

WO 03/083118	PCT/JP03/01917

340	345	350	355
		cc aag att gtg cac a la Lys Ile Val His I 365	
		ag caa cca cat gtg t ys Gln Pro His Val S 380	
	Leu Ala Leu Gln G	gc ttg aat gct ctg c ly Leu Asn Ala Leu L 95 4	
	•	tt agt gca tgg cac a he Ser Ala Trp His A 415	
		tg ggg tac aaa act t eu Gly Tyr Lys Thr P 430	
		ag gtg ctg gat gag c ln Val Leu Asp Glu L 445	
		tt ggg cag cac cag a al Gly Gln His Gln M 460 5/56	



caa	tat	tac	acc	tac	aag	cgg	cca	cgg	cag	tgg	ctg	tct	tcg	gct	ggt	1496
G1n	Tyr	Tyr	Thr	Tyr	Lys	Arg	Pro	Arg	Gln	Trp	Leu	Ser	Ser	Ala	G1y	
		470					475					480				
ctg	ggc	gca	atg	gga	ttt	ggg	ctg	cct	gct	gca	gct	ggt	gct	tct	gtg	1544
Leu	Gly	Ala	Met	Gly	Phe	Gly	Leu	Pro	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Ser	Val	
	485					490					495					
gct	aac	cca	ggt	gtc	aca	gtt	gtt	gat	att	gat	ggg	gat	ggt	agc	ttc	1592
Ala	Asn	Pro	Gly	Val	Thr	Val	Val	Asp	Ile	Asp	Gly	Asp	G1y	Ser	Phe	
500					505					510					515	
ctc	atg	aac	att	cag	gag	ctg	gca	ttg	atc	cgc	att	gag	aac	ctc	cct	1640
Leu	Met	Asn	Ile		Glu	Leu	Ala	Leu ·		Arg	Ile	Glu	Asn		Pro	
				520					525					530		
																1.000
											ggt					1688
Val	Lys	Val		Val	Leu	Asn	Asn		H1S	Leu	Gly	Met		Val	GIN	
			535					540					545			
+ ~ ~	an a	aat	200	+++	tac	224	aca.	99+	ann	aca	cat	202	tac	++~	aac	1736
		_					-				His					1100
11.0	GIU	550	AI B	1 116	1 9 1	Lys	555	ASII	VI B	піа	1112	560	1 9 1	Leu	Gly	
		550					555					500				
ลลด	CCS	gaa	tøt	gag	age	gag	ata	tat	cca	gat	ttt	gt.g	act	att	gct.	1784
		_									Phe					
	565		-,-			570		- ,			575					

aag	ggg	ttc	aat	att	cct	gca	gtc	cgt	gta	aca	aag	aag	agt	gaa	gtc	1832
														Glu		
580					585					590					595	
cgt	gcc	gcc	atc	aag	aag	atg	ctc	gag	act	cca	ggg	cca	tac	ttg	ttg	1880
Arg	Ala	Ala	Ile	Lys	Lys	Met	Leu	Glu	Thr	Pro	Gly	Pro	Tyr	Leu	Leu	
				600					605					610		
gat	atc	atc	gtc	ccg	cac	cag	gag	cat	gtg	ctg	cct	atg	atc	cca	agt	1928
Asp	Ile	Ile	Val	Pro	His	Gln	Glu	His	Val	Leu	Pro	Met	Ile	Pro	Ser	
			615					620					625			
														act		1976
Gly	Gly	Ala	Phe	Lys	Asp	Met	Ile	Leu	Asp	Gly	Asp			Thr	Val	
		630					635					640				
																0000
		tcta	taa	tctg	tatg	tt g	gcaa	agca	c ca	gccc	ggcc	tat	gttt	gac		2029
Tyr																
			,		_4		~~~+	. +	a + a +	++ ~+	a t a	tact	cta	tcaa	taacta	2089
ctg	aatg	acc	cata	aaga	gt g	gıaı	gccı	a ig	algi	ligi	avg	uguu	Cta	toda	taacta	2000
			+-+-		at a	+ ac+	cttc	+ σt	+++a	cttø	ttt	gatg	tgc	ttgg	catggt	2149
agg	ıgıc	aac	tatg	aacc	at a				0000		, , ,	8	-8-			
aat	ccta	att	aget	tect	gc t	gtct	aggt	t tg	tagt	gtgt	tgt	tttc	tgt	aggo	atatgc	2209
aat	0000	acc	авст		,60 .		-00-			0-0-	J		•			
atc	acaa	gat.	atca	itgta	ag t	ttct	tgtc	c ta	cata	tcaa	. taa	itaag	aga	ataa	agtact	2269
					_		-			-						
tct	atgo	aaa	aaaa	aaaa	aa a	aaaa	ıaaaa	ıa aa								2301

<210> 2

<211> 644

<212> PRT

<213> Oryza sativa var. kinmaze

<400> 2

Met Ala Thr Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ser Ala Ala Ala 1 1 5 15

Thr Ala Lys Thr Gly Arg Lys Asn His Gln Arg His His Val Leu Pro 20 25 30

Ala Arg Gly Arg Val Gly Ala Ala Ala Val Arg Cys Ser Ala Val Ser 35 40 45

Pro Val Thr Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Ala Thr Pro Leu Arg Pro 50 55 60

Trp Gly Pro Ala Glu Pro Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala 65 70 75 80

Leu Glu Arg Cys Gly Val Ser Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala 85 90 95

Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Pro Val Ile Thr Asn 100 105 110

His Leu Phe Arg His Glu Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala Ser Gly Tyr 8/56 115

120

125

- Ala Arg Ala Ser Gly Arg Val Gly Val Cys Val Ala Thr Ser Gly Pro 130 135 140
- Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Ala Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser 145 150 155 160
- Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val His Ser Arg Met Ile Gly
 165 170 175
- Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile 180 185 190
- Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Val
 195 200 205
- Ile Gln Glu Ala Phe Phe Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val 210 215 220
- Leu Val Asp Ile Pro Lys Asp Ile Gln Gln Met Ala Val Pro Val 225 230 235 240
- Trp Asp Thr Ser Met Asn Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Pro Lys
 245 250 255
- Pro Pro Ala Thr Glu Leu Leu Glu Gln Val Leu Arg Leu Val Gly Glu 260 265 270

Ser Arg Arg Pro Ile Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Ser Ala Ser Gly 275 280 285

Asp Glu Leu Arg Trp Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Thr Thr 290 295 300

Thr Leu Met Gly Leu Gly Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro Leu Ser Leu 305 310 315 320

Arg Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp 325 330 335

Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val 340 345 350

Thr Gly Lys Ile Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile 355 360 365

Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser 370 375 380

Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Gln Gly Leu Asn Ala Leu Leu 385 390 395 400

Gln Gln Ser Thr Thr Lys Thr Ser Ser Asp Phe Ser Ala Trp His Asn
405
410
415

Glu Leu Asp Gln Gln Lys Arg Glu Phe Pro Leu Gly Tyr Lys Thr Phe
420 425 430
10/56



Gly Glu Glu Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu
435 440 445

Thr Lys Gly Glu Ala Ile Ile Ala Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met
450 455 460

Trp Ala Ala Gln Tyr Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp Leu Ser 465 470 475 480

Ser Ala Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ala Gly
485 490 495

Ala Ser Val Ala Asn Pro Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp Gly Asp
500 505 510

Gly Ser Phe Leu Met Asn Ile Gln Glu Leu Ala Leu Ile Arg Ile Glu
515 520 525

Asn Leu Pro Val Lys Val Met Val Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met
530 535 540

Val Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr
545 550 555 560

Tyr Leu Gly Asn Pro Glu Cys Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp Phe Val
565 570 575

Thr Ile Ala Lys Gly Phe Asn Ile Pro Ala Val Arg Val Thr Lys Lys 11/56 **WO** 03/083118

PCT/JP03/01917

580 585 590

Ser Glu Val Arg Ala Ala Ile Lys Lys Met Leu Glu Thr Pro Gly Pro 595 600 605

Tyr Leu Leu Asp Ile Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met 610 615 620

Ile Pro Ser Gly Gly Ala Phe Lys Asp Met Ile Leu Asp Gly Asp Gly 625 630 635 640

Arg Thr Val Tyr

<210> 3

<211> 2300

<212> DNA

<213> Oryza sativa var. kinmaze

<220>

<221> CDS

<222> (48)..(1979)

<400> 3

cccaaaccca gaaaccctcg ccgccgccgc cgccgccacc acccacc atg gct acg 56

Met Ala Thr

1

acc	gcc	gcg	gcc	gcg	gcc	gcc	gcc	ctg	tcc	gcc	gcc	gcg	acg	gcc	aag	104
Thr	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Leu	Ser	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Lys	
	5	•				10					15					
acc	ggc	cgt	aag	aac	cac	cag	cga	cac	cac	gtc	ctt	ccc	gct	cga	ggc	152
Thr	Gly	Arg	Lys	Asn	His	Gln	Arg	His	His	Val	Leu	Pro	Ala	Arg	Gly	
20					25					30			•		35	
cgg	gtg	ggg	gcg	gcg	gcg	gtc	agg	tgc	tcg	gcg	gtg	tcc	ccg	gtc	acc	200
Arg	Val	Gly	Ala	Ala	Ala	Val	Arg	Cys	Ser	Ala	Val	Ser	Pro	Val	Thr	
				40					45					50		
ccg	ccg	tcc	ccg	gcg	ccg	ccg	gcc	acg	ccg	ctc	cgg	ccg	tgg	ggg	ccg	248
Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Thr	Pro	Leu	Arg	Pro	Trp	Gly	Pro	
			55					60					65			
gcc	gag	ccc	cgc	aag	ggc	gcg	gac	atc	ctc	gtg	gag	gcg	ctg	gag	cgg	296
Ala	Glu	Pro	Arg	Lys	Gly	Ala	Asp	Ile	Leu	Val	G1u	Ala	Leu	Glu	Arg	
		70					75					80			•	
tgc	ggc	gtc	agc	gac	gtg	ttc	gcc	tac	ccg	ggc	ggc	gcg	tcc	atg	gag	344
Cys	Gly	Val	Ser	Asp	Val	Phe	Ala	Tyr	Pro	Gly	Gly	Ala	Ser	Met	Glu	
	85					. 90					95					
atc	cac	cag	gcg	ctg	acg	cgc	tcc	ccg	gtc	atc	acc	aac	cac	ctc	ttc	392
Ile	His	Gln	Ala	Leu	Thr	Arg	Ser	Pro	Val	Ile	Thr	Asn	His	Leu	Phe	
100					105					110				•	115	
cgc	cac	gag	cag	ggc	gag	gcg	ttc	gcg	gcg	tcc	ggg	tac	gcg	cgc	gcg	440

13/56



Arg His Glu Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Arg Ala
120 125 130

tcc ggc cgc gtc ggg gtc tgc gtc gcc acc tcc ggc ccc ggg gca acc

tcc ggc cgc gtc ggg gtc tgc gtc gcc acc tcc ggc ccc ggg gca acc 488

Ser Gly Arg Val Gly Val Cys Val Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr

135

140

145

aac ctc gtg tcc gcg ctc gcc gac gcg ctg ctc gac tcc gtc ccg atg 536
Asn Leu Val Ser Ala Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Met
150 155 160

gtc gcc atc acg ggc cag gtc cac cgc cgc atg atc ggc acc gac gcc 584

Val Ala Ile Thr Gly Gln Val His Arg Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala

165 170 175

ttc cag gag acg ccc ata gtc gag gtc acc cgc tcc atc acc aag cac

Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His

180 185 190 195

aat tac ctt gtc ctt gat gtg gag gac atc ccc cgc gtc ata cag gaa 680 Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Val Ile Gln Glu 200 205 210

gcc ttc ttc ctc gcg tcc tcg ggc cgt cct ggc ccg gtg ctg gtc gac 728

Ala Phe Phe Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Val Asp

215 220 225

atc ccc aag gac atc cag cag cag atg gcc gtg ccg gtc tgg gac acc 776

The Pro Lys Asp Ile Gln Gln Met Ala Val Pro Val Trp Asp Thr

14/56

WO 03/083118

230 235

240

tcg	atg	aat	cta	cca	ggg	tac	atc	gca	cgc	ctg	ccc	aag	cca	ccc	gcg	824
											Pro					
	245					250					255					
aca	gaa	ttg	ctt	gag	cag	gtc	ttg	cgt	ctg	gtt	ggc	gag	tca	cgg	cgc	872
											Gly					
260					265					270					275	
ccg	att	ctc	tat	gtc	ggt	ggt	ggc	tgc	tct	gca	tct	ggt	gac	gaa	ttg	920
											Ser					
				280					285					290		
cgc	tgg	ttt	gtt	gag	ctg	act	ggt	atc	cca	gtt	aca	acc	act	ctg	atg	968
Arg	Trp	Phe	Val	Glu	Leu	Thr	Gly	Ile	Pro	Val	Thr	Thr	Thr	Leu	Met	
			295					300					305			
	,															
ggc	ctc	ggc	aat	ttc	ccc	agt	gac	gac	ccg	ttg	tcc	ctg	cgc	atg	ctt	1016
G1y	Leu	Gly	Asn	Phe	Pro	Ser	Asp	Asp	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Met	Leu	
		310)				315					320)			
ggg	atg	cat	ggc	ace	gtg	tac	gca	aat	tat	gco	gtg	gat	: aag	gct	gac	1064
Gly	Met	His	s Gly	Thr	· Val	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Val	Asp	Lys	Ala	Asp	
	325	j				330)				335	5				
ctg	g ttg	ct	t gcg	g ttt	ggt;	gtg	g cgg	ttt	gat	gat	cgt	gtg	g aca	ggg	g aaa	1112
Leu	ı Let	ı Let	ı Ala	a Phe	e G13	v Val	Arg	, Phe	. Asp	Ası	Are	g Val	l Thi	Gly	/ Lys	
340)				349	5				350)				355	

15/56

att	gag	gct	ttt	gca	agc	agg	gcc	aag	att	gtg	cac	att	gac	att	gat	1160
											His					
110				360				·	365					370		
cca	gca	gag	att	gga	aag	aac	aag	caa	cca	cat	gtg	tca	att	tgc	gca	1208
											Val					
			375	•	·			380					385			
gat	gtt	aag	ctt	gct	tta	cag	ggc	ttg	aat	gct	ctg	cta	caa	cag	agc	1256
											Leu					
		390					395					400				
aca	aca	aag	aca	agt	tct	gat	ttt	agt	gca	tgg	cac	aat	gag	ttg	gac	1304
Thr	Thr	Lys	Thr	Ser	Ser	Asp	Phe	Ser	Ala	Trp	His	Asn	Glu	Leu	Asp	
	405					410					415					
cag	cag	aag	agg	gag	ttt	cct	ctg	ggg	tac	aaa	act	ttt	ggt	gaa	gag	1352
Gln	G1n	Lys	Arg	Glu	Phe	Pro	Leu	G1 y	Tyr	Lys	Thr	Phe	Gly	Glu	Glu	
420					425					430					435	
atc	cca	ccg	caa	tat	gcc	att	cag	gtg	ctg	gat	gag	ctg	acg	aaa	ggt	1400
Ile	Pro	Pro	G1n	Tyr	Ala	Ile	G1n	Val	Leu	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Gly	
				440					445					450		•
gag	gca	atc	atc	gct	act	ggt	gtt	ggg	cag	cac	cag	atg	tgg	gcg	gca	1448
Glu	Ala	Ile	Ile	Ala	Thr	Gly	Val	Gly	Gln	His	G1n	Met	Trp	Ala	Ala	
			455	•				460					465			



		•												_			
caa	tat	tac	acc	tac	aag	cgg	cca	cgg	cag	tgg	ctg	tct	tcg	gct	ggt	1496	
Gln '	Tyr	Tyr	Thr	Tyr	Lys	Arg	Pro	Arg	Gln	Trp	Leu	Ser	Ser	Ala	Gly		
		470					475					480					
ctg	ggc	gca	atg	gga	ttt	ggg	ctg	cct	gct	gca	gct	ggt	gct	tct	gtg	1544	
Leu	Gly	Ala	Met	Gly	Phe	Gly	Leu	Pro	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Ser	Val		
	485					490					495						
gct	aac	cca	ggt	gtc	aca	gtt	gtt	gat	att	gat	ggg	gat	ggt	agc	ttc	1592	
					Thr												
500					505					510					515		
ctc	atg	aac	att	cag	gag	ctg	gca	ttg	atc	cgc	att	gag	aac	ctc	cct	1640	
					Glu												
				520					525					530			
gtg	aag	gtg	g atg	gte	ttg	aac	aac	caa	. cat	ttg	ggt	atg	gtg	gtg	caa	1688	
															Gln		
	-		535					540					545				
ttg	gag	gai	t agg	g tti	t tac	aag	g gcg	g aat	agg	g gcg	; cat	aca	tac	ttg	g ggc	1736	
															ı Gly		
		550		_			555					560					
aac	CCS		a tgi	t ga	g ago	c gag	g ata	a ta	t cca	a gat	t tt 1	t gtg	g ac	t at	t gct	1784	
															e Ala		
7151	565		u - 0 , .			570					57						
	500	,				- · ·	-										
		A_A		+ 0+	t cc:	t ac	a at	c co	t ot	a aca	a aa	g aa	g ag	t ga	a gtc	1832	
aag	gg	g tt	c aa	L 21 L	0 00	o gu	a gi	0 0g 17/						J .	ū		

17/56



Lys	Gly	Phe	Asn	Ile	Pro	Ala	Val	Arg	Val	Thr	Lys	Lys	Ser	Glu	Val
580					585					590					595

cgt	gcc	gcc	atc	aag	aag	atg	ctc	gag	act	cca	ggg	cca	tac	ttg	ttg	1880
Arg	Ala	Ala	Ile	Lys	Lys	Met	Leu	Glu	Thr	Pro	Gly	Pro	Tyr	Leu	Leu	
				600					605					610		

gat	atc	atc	gtc	ccg	cac	cag	gag	cat	gtg	ctg	cct	atg	atc	cca	agt	1928
Asp	Ile	Ile	Val	Pro	His	G1n	Glu	His	Val	Leu	Pro	Met	Ile	Pro	Ser	
			615					620					625			

ggg	ggc	gca	ttc	aag	gac	atg	atc	ctg	gat	ggt	gat	ggc	agg	act	gtg	1976
Gly	Gly	Ala	Phe	Lys	Asp	Met	Ile	Leu	Asp	Gly	Asp	Gly	Arg	Thr	Val	
		630					635					640				

tat	taatctataa	tctgtatgtt	ggcaaagcac	cagcccggcc	tatgtttgac	2029
Tyr						

ctgaatgacc cataaagagt ggtatgccta tgatgttgt atgtgctcta tcaataacta 2089
aggtgtcaac tatgaaccat atgctcttct gttttacttg tttgatgtgc ttggcatggt 2149
aatcctaatt agcttcctgc tgtctaggtt tgtagtgtgt tgtttctgt aggcatatgc 2209
atcacaagat atcatgtaag tttcttgtcc tacatatcaa taataagaga ataaagtact 2269
tctatgcaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa a

<210> 4

<211> 644

<212> PRT

<213> Oryza sativa var. kinmaze

<400> 4

Met Ala Thr Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ser Ala Ala Ala 11 15 15

Thr Ala Lys Thr Gly Arg Lys Asn His Gln Arg His His Val Leu Pro 20 25 30

Ala Arg Gly Arg Val Gly Ala Ala Ala Val Arg Cys Ser Ala Val Ser . 35 40 45

Pro Val Thr Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Ala Thr Pro Leu Arg Pro 50 55 60

Trp Gly Pro Ala Glu Pro Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala 65 70 75 80

Leu Glu Arg Cys Gly Val Ser Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala 85 90 95

Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Pro Val Ile Thr Asn 100 105 110

His Leu Phe Arg His Glu Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala Ser Gly Tyr 115 120 125

- Ala Arg Ala Ser Gly Arg Val Gly Val Cys Val Ala Thr Ser Gly Pro 130 135 140
- Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Ala Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser 145 . 150 155 160
- Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val His Arg Arg Met Ile Gly
 165 170 175
- Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile 180 185 190
- Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Val 195 200 205
- Ile Gln Glu Ala Phe Phe Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val 210 215 220
- Leu Val Asp Ile Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Met Ala Val Pro Val 225 230 235 240
- Trp Asp Thr Ser Met Asn Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Pro Lys
 245 250 255
- Pro Pro Ala Thr Glu Leu Leu Glu Gln Val Leu Arg Leu Val Gly Glu 260 265 270
- Ser Arg Arg Pro Ile Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Ser Ala Ser Gly 20/56

PCT/JP03/01917

275 280 285

Asp Glu Leu Arg Trp Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Thr Thr 290 295 300

Thr Leu Met Gly Leu Gly Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro Leu Ser Leu 305 310 315 320

Arg Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp 325 330 335

Lys Ala Asp Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val
340 345 350

Thr Gly Lys Ile Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile 355 360 365

Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser 370 375 380

Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Gln Gly Leu Asn Ala Leu Leu 385 390 395 400

Gln Gln Ser Thr Thr Lys Thr Ser Ser Asp Phe Ser Ala Trp His Asn
405
410
415

Glu Leu Asp Gln Gln Lys Arg Glu Phe Pro Leu Gly Tyr Lys Thr Phe
420 425 430



Gly Glu Glu Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu
435 440 445

Thr Lys Gly Glu Ala Ile Ile Ala Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met
450 455 460

Trp Ala Ala Gln Tyr Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp Leu Ser 465 470 475 480

Ser Ala Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ala Gly
485 490 495

Ala Ser Val Ala Asn Pro Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp Gly Asp 500 505 510

Gly Ser Phe Leu Met Asn Ile Gln Glu Leu Ala Leu Ile Arg Ile Glu
515 520 525

Asn Leu Pro Val Lys Val Met Val Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met 530 535 540

Val Val Gln Leu Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr 545 550 555 560

Tyr Leu Gly Asn Pro Glu Cys Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp Phe Val 565 570 575

Thr Ile Ala Lys Gly Phe Asn Ile Pro Ala Val Arg Val Thr Lys Lys
580 585 590
22/56



Ser Glu Val Arg Ala Ala Ile Lys Lys Met Leu Glu Thr Pro Gly Pro 595 600 605

Tyr Leu Leu Asp Ile Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met 610 615 620

Ile Pro Ser Gly Gly Ala Phe Lys Asp Met Ile Leu Asp Gly Asp Gly 625 630 635 640

Arg Thr Val Tyr

<210> 5

<211> 2294

<212> DNA

<213> Oryza sativa var. kinmaze

<220>

<221> CDS

<222> (48)..(1979)

<400> 5

cccaaaccca gaaaccctcg ccgccgccgc cgccgccacc acccacc atg gct acg 56

Met Ala Thr

1

Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ser Ala Ala Ala Thr Ala Lys
5 10 15

- acc ggc cgt aag aac cac cag cga cac cac gtc ctt ccc gct cga ggc 152

 Thr Gly Arg Lys Asn His Gln Arg His His Val Leu Pro Ala Arg Gly
 20 25 30 35
- cgg gtg ggg gcg gcg gtc agg tgc tcg gcg gtg tcc ccg gtc acc 200
 Arg Val Gly Ala Ala Ala Val Arg Cys Ser Ala Val Ser Pro Val Thr
 40 45 50
- ccg ccg tcc ccg gcg ccg ccg gcc acg ccg ctc cgg ccg tgg ggg ccg 248

 Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Ala Thr Pro Leu Arg Pro Trp Gly Pro

 55 60 65
- gcc gag ccc cgc aag ggc gcg gac atc ctc gtg gag gcg ctg gag cgg 296
 Ala Glu Pro Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg
 70 75 80
- tgc ggc gtc agc gac gtg ttc gcc tac ccg ggc ggc gcg tcc atg gag 344

 Cys Gly Val Ser Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala Ser Met Glu

 85 90 95
- atc cac cag gcg ctg acg cgc tcc ccg gtc atc acc aac cac ctc ttc 392

 Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Pro Val Ile Thr Asn His Leu Phe

 100 105 110 115
- cgc cac gag cag ggc gag gcg ttc gcg gcg tcc ggg tac gcg cgc gcg 440
 Arg His Glu Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Arg Ala
 24/56

120

125 130

tcc	ggc	cgc	gtc	ggg	gtc	tgc	gtc	gcc	acc	tcc	ggc	ccc	ggg	gca	acc	488
											Gly					
			135					140					145			
aac	ctc	gtg	tcc	gcg	ctc	gcc	gac	gcg	ctg	ctc	gac	tcc	gtc	ccg	atg	536
Asn	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Ala	Asp	Ala	Leu	Leu	Asp	Ser	Val	Pro	Met	
		150					155					160				
			•													
											atc					584
Val	Ala	Ile	Thr	Gly	Gln	Val	His	Arg	Arg	Met	Ile	G1y	Thr	Asp	Ala	
	165					170					175					
																600
											tcc					632
Phe	Gln	Glu	Thr	Pro	Ile	Val	Glu	Val	Thr		Ser	Ile	Thr	· Lys		
180					185					190	•				195	
									•			4				680
															gaa	000
Asn	Tyr	Leu	ı Val			Val	. Glu	. Asp			Arg	, vai	TTE	210	Glu	
				200)				205	•				210	•	
					,					- ~~		r ata	r cto	a ata	e gac	728
															gac Asp	
Ala	Phe	? Phe			a Sei	. Sei	. G1)	7 AF		. GI	y IIC	, 4 CI.J	22!		l Asp	
			219)				220	,				ري	•		

atc ccc aag gac atc cag cag cag atg gcc gtg ccg gtc tgg gac acc 776

Ile Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Met Ala Val Pro Val Trp Asp Thr

230 235 240

tcg	atg	aat	cta	cca	ggg	tac	atc	gca	cgc	ctg	ccc	aag	cca	ccc	gcg	824
				Pro												
	245					250					255					
aca	gaa	ttg	ctt	gag	cag	gtc	ttg	cgt	ctg	gtt	ggc	gag	tca	cgg	cgc	872
Thr	Glu	Leu	Leu	Glu	Gln	Val	Leu	Arg	Leu	Val	Gly	Glu	Ser	Arg	Arg	
260		•			265					270					275	
ccg	att	ctc	tat	gtc	ggt	ggt	ggc	tgc	tct	gca	tct	ggt	gac	gaa	ttg	920
Pro	Ile	Leu	Tyr	Val	Gly	Gly	Gly	Cys	Ser	Ala	Ser	Gly	Asp	G1u	Leu	
				280					285					290	ı	
															atg	968
Arg	Trp	Phe	Val	Glu	Leu	Thr	Gly	Ile	Pro	Val	Thr	Thr			ı Met	
			295	5				300	•				305	5		
																1010
															ctt	1016
Gl ₃	, Lei	ı Gly	y Ası	n Phe	Pro	Ser	- Asp	Asp	Pro) Lei	ı Se			g Me	t Leu	
		310)				319	5				320)			
																1064
															t gac	1064
Gl	y Me	t Hi	s Gl	y Th	r Va	l Ty	r Al	a Ası	n Ty:	r Ala			р Гу	s Al	a Asp	
	32	5				330	0				33	b				
																1110
															g aaa	1112
Le	u Le	u Le	u Al	a Ph	e Gl	y Va	l Ar	g Ph	e As			g Va	1 Th	r Gl	y Lys	
34	0				34	5				35	0				355	



att	aaa	act	ttt	gca	agc	agg	gcc	aag	att	gtg	cac	att	gac	att	gat	1160
												Ile				
116	Olu	ma	1110	360		8			365					370		
				000												
cca	aca	៤ ៦ ៤	att	gga	aag	aac	aag	caa	cca	cat	gtg	tca	att	tgc	gca	1208
												Ser				
110	nia	014	375	,	_,_		•	380					385			
			0.0													
gat	gtt	aag	ctt	gct	tta	cag	ggc	ttg	aat	gct	ctg	.cta	caa	cag	agc	1256
												Leu				
-		390					395					400				
aca	aca	aag	aca	agt	tct	gat	ttt	agt	gca	tgg	cac	aat	gag	ttg	gac	1304
												Asn				
	405					410					415					
cag	cag	aag	agg	gag	ttt	cct	ctg	ggg	tac	aaa	act	ttt	ggt	gaa	gag	1352
G1n	Gln	Lys	Arg	Glu	Phe	Pro	Leu	G1y	Tyr	Lys	Thr	Phe	Gly	Glu	Glu	
420					425	;				430					435	
atc	cca	. ccg	; caa	tat	gcc	att	cag	gtg	ctg	gat	gag	ctg	ace	aaa	ggt	1400
Ile	Pro	Pro	Glr.	Tyr	Ala	a Ile	Gln	Val	Leu	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Gly	
				440)				445					450)	
gag	gca	ato	ato	gct	act	t ggt	gtt	ggg	g cag	cac	cag	g atg	tgg	g gcg	g gca	1448
Glu	ı Ala	11e	e I16	e Ala	a Thi	r Gly	v Val	. G13	Gln	His	Glr	ı Met	Tr	Ala	a Ala	
			45	5				460)				46	5		
caa	a tat	t ta	c ac	c tac	c aa	g cg	g cca	a cgg		g tgg	g ctg	g tct	tc	g gc	t ggt	1496

27/56



Gln Tyr Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp Leu Ser Ser Ala Gly
470 475 480

ctg ggc gca atg gga ttt ggg ctg cct gct gca gct ggt gct tct gtg
Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ala Gly Ala Ser Val
485
490
495

gct aac cca ggt gtc aca gtt gtt gat att gat ggg gat ggt agc ttc 1592
Ala Asn Pro Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe
500 505 510 515

ctc atg aac att cag gag ctg gca ttg atc cgc att gag aac ctc cct 1640
Leu Met Asn Ile Gln Glu Leu Ala Leu Ile Arg Ile Glu Asn Leu Pro
520 525 530

gtg aag gtg atg gtg ttg aac aac caa cat ttg ggt atg gtg gtg caa 1688
Val Lys Val Met Val Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Val Gln
535 540 545

tgg gag gat agg ttt tac aag gcg aat agg gcg cat aca tac ttg ggc 1736
Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly
550 555 560

aac ccg gaa tgt gag agc gag ata tat cca gat ttt gtg act att gct 1784
Asn Pro Glu Cys Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp Phe Val Thr Ile Ala
565 570 575

aag ggg ttc aat att cct gca gtc cgt gta aca aag aag agt gaa gtc 1832 Lys Gly Phe Asn Ile Pro Ala Val Arg Val Thr Lys Lys Ser Glu Val 28/56 580 585 590 595

cgt gcc gcc atc aag aag atg ctc gag act cca ggg cca tac ttg ttg 1880 Arg Ala Ala Ile Lys Lys Met Leu Glu Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu 600 605 610

gat atc atc gtc ccg cac cag gag cat gtg ctg cct atg atc cca att 1928
Asp Ile Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro Ile
615 620 625

ggg ggc gca ttc aag gac atg atc ctg gat ggt gat ggc agg act gtg 1976 Gly Gly Ala Phe Lys Asp Met Ile Leu Asp Gly Asp Gly Arg Thr Val 630 635 640

tat taatctataa totgtatgtt ggcaaagcac cagcccggcc tatgtttgac 2029
Tyr

ctgaatgacc cataaagagt ggtatgccta tgatgttgt atgtgctcta tcaataacta 2089

aggtgtcaac tatgaaccat atgctcttct gttttacttg tttgatgtgc ttggcatggt 2149

aatcctaatt agcttcctgc tgtctaggtt tgtagtgtgt tgttttctgt aggcatatgc 2209

atcacaagat atcatgtaag tttcttgtcc tacatatcaa taataagaga ataaagtact 2269

tctatgtaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa 2294

<211> 644

<212> PRT

<213> Oryza sativa var. kinmaze

<400> 6

Met Ala Thr Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ser Ala Ala Ala

1 5 10 15

Thr Ala Lys Thr Gly Arg Lys Asn His Gln Arg His His Val Leu Pro

Ala Arg Gly Arg Val Gly Ala Ala Ala Val Arg Cys Ser Ala Val Ser 35 40 45

Pro Val Thr Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Ala Thr Pro Leu Arg Pro 50 55 60

Trp Gly Pro Ala Glu Pro Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala
65 70 75 80

Leu Glu Arg Cys Gly Val Ser Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala 85 90 95

Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Pro Val Ile Thr Asn 100 105 110

His Leu Phe Arg His Glu Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala Ser Gly Tyr 115 120 125 Ala Arg Ala Ser Gly Arg Val Gly Val Cys Val Ala Thr Ser Gly Pro 130 135 140

Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Ala Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser 145 150 155 160

Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val His Arg Arg Met Ile Gly
165 170 175

Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile 180 185 190

Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Val
195 200 205

Ile Gln Glu Ala Phe Phe Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val 210 215 220

Leu Val Asp Ile Pro Lys Asp Ile Gln Gln Met Ala Val Pro Val 225 230 235 240

Trp Asp Thr Ser Met Asn Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Pro Lys
245
250
255

Pro Pro Ala Thr Glu Leu Leu Glu Gln Val Leu Arg Leu Val Gly Glu 260 265 270

Ser Arg Arg Pro Ile Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Ser Ala Ser Gly
275
280
285
31/56



Asp Glu Leu Arg Trp Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Thr Thr 290 295 300

Thr Leu Met Gly Leu Gly Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro Leu Ser Leu 305 310 315 320

Arg Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp 325 330 335

Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val
340 345 350

Thr Gly Lys Ile Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile 355 360 365

Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser 370 375 380

Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Gln Gly Leu Asn Ala Leu Leu 385 390 395 400

Gln Gln Ser Thr Thr Lys Thr Ser Ser Asp Phe Ser Ala Trp His Asn 405 410 415

Glu Leu Asp Gln Gln Lys Arg Glu Phe Pro Leu Gly Tyr Lys Thr Phe
420 425 430

Gly Glu Glu Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu 32/56

PCT/JP03/01917

435 440 445

Thr Lys Gly Glu Ala Ile Ile Ala Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met 450 455 460

Trp Ala Ala Gln Tyr Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp Leu Ser 465 470 475 480

Ser Ala Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ala Gly
485 490 495

Ala Ser Val Ala Asn Pro Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp Gly Asp 500 505 510

Gly Ser Phe Leu Met Asn Ile Gln Glu Leu Ala Leu Ile Arg Ile Glu
515 520 525

Asn Leu Pro Val Lys Val Met Val Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met 530 535 540

Val Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr
545 550 555 560

Tyr Leu Gly Asn Pro Glu Cys Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp Phe Val
565 570 575

Thr Ile Ala Lys Gly Phe Asn Ile Pro Ala Val Arg Val Thr Lys Lys 580 585 590



Ser Glu Val Arg Ala Ala Ile Lys Lys Met Leu Glu Thr Pro Gly Pro 595 600 605

Tyr Leu Leu Asp Ile Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met 610 615 620

Ile Pro Ile Gly Gly Ala Phe Lys Asp Met Ile Leu Asp Gly Asp Gly 625 630 635 640

Arg Thr Val Tyr

<210> 7

<211> 2294

<212> DNA

<213> Oryza sativa var. kinmaze

<220>

<221> CDS

<222> (48).. (1979)

<400> 7

cccaaaccca gaaaccctcg ccgccgccgc cgccgccacc acccacc atg gct acg 56

Met Ala Thr

1

acc	ggc	cgt	aag	aac	cac	cag	cga	cac	cac	gtc	ctt	ccc	gct	cga	ggc	152
				Asn												
20		_			25					30					35	
cgg	gtg	ggg	gcg	gcg	gcg	gtc	agg	tgc	tcg	gcg	gtg	tcc	ccg	gtc	acc	200
				Ala												
				40					45					50		
ccg	ccg	tcc	ccg	gcg	ccg	ccg	gcc	acg	ccg	ctc	cgg	ccg	tgg	ggg	ccg	248
Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Thr	Pro	Leu	Arg	Pro	Trp	Gly	Pro	
			55					60					65			
				aag												296
Ala	Glu	Pro	Arg	Lys	Gly	Ala	Asp	Ile	Leu	Val	Glu	Ala	Leu	ı Glu	ı Arg	
		70)				75	;				80	1			
														_		0.4.4
															g gag	344
Cys	Gly	Va.	l Ser	r Asp	Val	Phe	e Ala	a Tyr	Pro	o Gly			a Sei	r Me	t Glu	
	85	;				9()				98	5				
														+	. ++.	392
															c ttc	
I16	e His	s G1	n Al	a Lei			g Sei	r Pro	ya.			r ASI	11 III	s re	u Phe 115	
100)				10	5				11	U				110	,

cgc cac gag cag ggc gag gcg ttc gcg gcg tcc ggg tac gcg cgc gcg 440
Arg His Glu Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Arg Ala

120 125 130
35/56

tcc	ggc	cgc	gtc	ggg	gtc	tgc	gtc	gcc	acc	tcc	ggc	ccc	ggg	gca	acc	488
														Ala		
			135					140					145			
aac	ctc	gtg	tcc	gcg	ctc	gcc	gac	gcg	ctg	ctc	gac	tcc	gtc	ccg	atg	536
Asn	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Ala	Asp	Ala	Leu	Leu	Asp	Ser	Val	Pro	Met	
		150					155					160				
														gac		584
Val	Ala	Ile	Thr	Gly	Gln	Val	His	Arg	Arg	Met	Ile	Gly	Thr	Asp	Ala	
	165					170					175					
																coo
														aag		632
Phe	Gln	Glu	Thr	Pro	Ile	Val	Glu	Val	Thr			lle	Thr	Lys		
180					185					190					195	
																680
															gaa	000
Asn	Tyr	Let	ı Val			Val	Glu	ı Asp) AIE	y val	. 116	210	Glu	
				200)				205)				210	,	
						4			h 001	+ aac		a orta	e eta	e eto	gac	728
															gac L Asp	
Ala	a Phe	e Pho			a Sei	. Sei	r Gly	220		J (11)	, 11,	, va	22		l Asp	
			21	o				44	J				22	_		
						~ ~~	a 09	o at	a ar	c øt	g CC	g gt.	c tg	g ga	c acc	776
															c acc p Thr	
11	e Pr			р П	e GI	n GI	n G1:		O AL	u va		24		<u> </u>	•	
		23	U				43	J				a-T	•			

4	o+ ~	oot	cta	cca	aaā	tac	atc	gca	CEC	ctg	ccc	aag	cca	ccc	gcg	824
												Lys				
		ASII	Leu	110	Uly	250	110				255	-•				
	245					200										
		***	o++	~~~	o a o	at c	+ +σ	cet	ctg	gtt	ggc	gag	tca	cgg	cgc	872
												Glu				
	GIU	Leu	Leu	GIU	265	Val	Leu	111 B	БСС	270	01,	-		J	275	
260					200					2.0						
			4 4		~~+	aat	aac	tac	tct	gca	tet	ggt	gac	gaa	ttg	920
												Gly				
Pro	TIE	Leu	lyr		GIY	GIY	GIY	Cys	285	niu	501	0_,		290		
				280					200							
	,				o t a	aat	aat	atc	cca	øt.t.	aca	acc	act	ctg	atg	968
												Thr				
Arg	Trp	Pne			Leu	1111	Gly	300		, 41			305			
			295)				500								
				. ++0		a n t	່ ຜລເ	gac	cog	ttg	tcc	ctg	cgc	: atg	g ctt	1016
															Leu	
Gly	Leu			i File	FIO	. Set	315		, 110	200		320				
		310	J				510	,				0.20				
			<u>.</u>			. +		. aat	- tat	ge.c	e ete	g gat	aag	z gci	t gac	1064
															a Asp	
Gly			S GI	y ini	r val	330		1 1131	1 1,1	. 1110	338					
	329	•				331	J				00.	,				
					1			~ ++·	+ ra:	t orat	r ca	t ota	z ac	a gg	g aaa	1112
															g aaa	
		u Le	u Al	a Ph			ı Ar	g rn	e as			Б Vа.	L 111.	. 01	y Lys 355	
340)				34	b				350	J				550	
										, .		,	.		++	1160
att	; ga	g gc	t tt	t gc	a ag	c ag	g gc	c aa 37/		t gt	g ca	c at	t ga	c at	t gat	1100

37/56



Ile Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp 360 365 370

- cca gca gag att gga aag aac aag caa cca cat gtg tca att tgc gca 1208 Pro Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser Ile Cys Ala 375 380 385
- gat gtt aag ctt gct tta cag ggc ttg aat gct ctg cta caa cag agc 1256 Asp Val Lys Leu Ala Leu Gln Gly Leu Asn Ala Leu Leu Gln Gln Ser 390 395 400
- aca aca aag aca agt tct gat ttt agt gca tgg cac aat gag ttg gac 1304
 Thr Thr Lys Thr Ser Ser Asp Phe Ser Ala Trp His Asn Glu Leu Asp
 405 410 415
- cag cag aag agg gag ttt cct ctg ggg tac aaa act ttt ggt gaa gag 1352 Gln Gln Lys Arg Glu Phe Pro Leu Gly Tyr Lys Thr Phe Gly Glu Glu 420 425 430 435
- atc cca ccg caa tat gcc att cag gtg ctg gat gag ctg acg aaa ggt 1400

 Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu Thr Lys Gly

 440 445 450
- gag gca atc atc gct act ggt gtt ggg cag cac cag atg tgg gcg gca 1448 Glu Ala Ile Ile Ala Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala 455 460 465
- caa tat tac acc tac aag cgg cca cgg cag tgg ctg tct tcg gct ggt 1496 Gln Tyr Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp Leu Ser Ser Ala Gly 38/56

PCT/JP03/01917

470 475 480

ctg ggc gca atg gga ttt ggg ctg cct gct gca gct ggt gct tct gtg

Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ala Gly Ala Ser Val

485

490

495

gct aac cca ggt gtc aca gtt gtt gat att gat ggg gat ggt agc ttc 1592
Ala Asn Pro Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe
500 505 515

ctc atg aac att cag gag ctg gca ttg atc cgc att gag aac ctc cct 1640
Leu Met Asn Ile Gln Glu Leu Ala Leu Ile Arg Ile Glu Asn Leu Pro
520 525 530

gtg aag gtg atg gtg ttg aac aac caa cat ttg ggt atg gtg gtg caa 1688 Val Lys Val Met Val Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Val Gln 535 540 545

ttg gag gat agg ttt tac aag gcg aat agg gcg cat aca tac ttg ggc 1736 Leu Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly 550 555 560

aac ccg gaa tgt gag agc gag ata tat cca gat ttt gtg act att gct 1784
Asn Pro Glu Cys Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp Phe Val Thr Ile Ala
565 570 575

aag ggg ttc aat att cct gca gtc cgt gta aca aag aag agt gaa gtc 1832 Lys Gly Phe Asn Ile Pro Ala Val Arg Val Thr Lys Lys Ser Glu Val 580 585 590 595



2294

cgt gcc gcc	atc aag aag	atg ctc gag	act cca ggg	cca tac ttg	ttg 1880
Arg Ala Ala	Ile Lys Lys	Met Leu Glu	Thr Pro Gly	Pro Tyr Leu	Leu
	600		605	610	
gat atc atc	gtc ccg cac	cag gag cat	gtg ctg cct	atg atc cca	att 1928
	Val Pro His				
	615	620		625	
ggg ggc gca	ttc aag gac	atg atc ctg	gat ggt gat	ggc agg act	gtg 1976
	Phe Lys Asp				
630		635		640	
tat taatcta	taa totgtatg	tt ggcaaagca	c cagcccggcc	tatgtttgac	2029
Tyr					
ctgaatgacc	cataaagagt g	gtatgccta tg	atgtttgt atg	tgctcta tcaa	taacta 2089
aggtgtcaac	tatgaaccat a	tgctcttct gt	tttacttg ttt	gatgtgc ttgg	gcatggt 2149
aatcctaatt	agcttcctgc t	gtctaggtt tg	tagtgtgt tgt	tttctgt agg	catatgc 2209

<210> 8

<211> 644

tctatgtaaa aaaaaaaaaa aaaaa

atcacaagat atcatgtaag tttcttgtcc tacatatcaa taataagaga ataaagtact 2269

<212> PRT

<213> Oryza sativa var. kinmaze

<400> 8

Met Ala Thr Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ser Ala Ala Ala

1 5 10 15

Thr Ala Lys Thr Gly Arg Lys Asn His Gln Arg His His Val Leu Pro

Ala Arg Gly Arg Val Gly Ala Ala Ala Val Arg Cys Ser Ala Val Ser 35 40 45

Pro Val Thr Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Ala Thr Pro Leu Arg Pro 50 55 60

Trp Gly Pro Ala Glu Pro Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala 65 70 75 80

Leu Glu Arg Cys Gly Val Ser Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala 85 90 95

Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Pro Val Ile Thr Asn 100 105 110

His Leu Phe Arg His Glu Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala Ser Gly Tyr 115 120 125

Ala Arg Ala Ser Gly Arg Val Gly Val Cys Val Ala Thr Ser Gly Pro 41/56

PCT/JP03/01917

130

135

140

Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Ala Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser 145 150 155 160

Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val His Arg Arg Met Ile Gly
165 170 175

Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile 180 185 190

Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Val
195 200 205

Ile Gln Glu Ala Phe Phe Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val 210 215 220

Leu Val Asp Ile Pro Lys Asp Ile Gln Gln Met Ala Val Pro Val 225 230 235 240

Trp Asp Thr Ser Met Asn Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Pro Lys
245
255

Pro Pro Ala Thr Glu Leu Leu Glu Gln Val Leu Arg Leu Val Gly Glu 260 265 270

Ser Arg Pro Ile Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Ser Ala Ser Gly 275 280 285

Asp Glu Leu Arg Trp Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Thr Thr 290 295 300

Thr Leu Met Gly Leu Gly Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro Leu Ser Leu 305 310 315 320

Arg Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp 325 330 335

Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val 340 345 350

Thr Gly Lys Ile Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile 355 360 365

Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser 370 375 380

Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Gln Gly Leu Asn Ala Leu Leu 385 390 395 400

Gln Gln Ser Thr Thr Lys Thr Ser Ser Asp Phe Ser Ala Trp His Asn 405 410 415

Glu Leu Asp Gln Gln Lys Arg Glu Phe Pro Leu Gly Tyr Lys Thr Phe
420 425 430

Gly Glu Glu Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu 435 440 445 Thr Lys Gly Glu Ala Ile Ile Ala Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met 450 455 460

Trp Ala Ala Gln Tyr Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp Leu Ser 465 470 475 480

Ser Ala Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ala Gly
485 490 495

Ala Ser Val Ala Asn Pro Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp Gly Asp 500 505 510

Gly Ser Phe Leu Met Asn Ile Gln Glu Leu Ala Leu Ile Arg Ile Glu
515 520 525

Asn Leu Pro Val Lys Val Met Val Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met 530 535 540

Val Val Gln Leu Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr 545 550 555 560

Tyr Leu Gly Asn Pro Glu Cys Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp Phe Val 565 570 575

Thr Ile Ala Lys Gly Phe Asn Ile Pro Ala Val Arg Val Thr Lys Lys 580 585 590

Ser Glu Val Arg Ala Ala Ile Lys Lys Met Leu Glu Thr Pro Gly Pro 44/56

PCT/JP03/01917

595

600

605

Tyr Leu Leu Asp Ile Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met 610 620

Ile Pro Ile Gly Gly Ala Phe Lys Asp Met Ile Leu Asp Gly Asp Gly 625 630 635 640

Arg Thr Val Tyr

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 9

gctctgctac aacagagcac a

21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

PCT/JP03/01917

<	2	2	0	>
---	---	---	---	---

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 10

agtcctgcca tcaccatcca g

21

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 11

ctgggacacc tcgatgaat

19

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 12

caacaaacca gcgcaattcg tcacc

<210>	13
-------	----

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 13

catcaccaac cacctctt

18

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 14

aactgggata ccagtcagct c

21

<210> 15

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 15

tgtgcttggt gatgga

16

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 16

tcaaggacat gatcctggat gg

22

<210> 17

⟨211⟩ 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 17

cagcgacgtg ttcgccta

18

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 18

ccaccgacat agagaatc

18

<210> 19

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 19

acacggactg caggaata

18

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 20

ttacaaggcg aatagggc

18

<210> 21

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 21

gcatcttctt gatggcg

17

<210> 22

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>



<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 22

atgcatggca cggtgtac

18

<210> 23

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 23

gattgcctca cctttcg

17

<210> 24

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 24

aggtgtcaca gttgttg

17

<210>	25
-------	----

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 25

agaggtggtt ggtgatg

17

<210> 26

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 26

gctttgccaa catacag

17

<210> 27

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 27

cagcccaaat cccattg

17

<210> 28

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 28

atgtaccctg gtagattc

18

<210> 29

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<220>



<221> variation

<222> 15

<223> n represents a, c, g or t

<400> 29

gtttygctay ccggngg

17

<210> 30

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 30

ggaaacagct atgaccatg

19

<210> 31

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 31



ccgggagctg catgtgtcag agg

23

- ⟨210⟩ 32
- <211> 23
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Description of Artificial Sequence:primer
- <400> 32

gggctggcaa gccacgtttg gtg

23

- <210> 33
- <211> 30
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Description of Artificial Sequence:primer
- <400> 33

ccccagccgc atgatcggca ccgacgcctt

30

- <210> 34
- <211> 27

РСТ/ЈР03/01917

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 34

cggtgccgat catgcggctg gggacct

27





特許協力条約に基づく国際出願願書 原本(出顧用) - 印刷日時 2003年02月21日(21.02.2003) 金曜日 11時09分58秒

PH-1733-PCT

VIII-5-1	不利にならない開示又は新規 性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性 喪失の例外に関する申立て(規 則4.17(v)及び51の2.1(a)(v))	本国際出願に関し、
		クミアイ化学工業株式会社は、 本国際出願の請求項に記載された対象が以下のよう に開示されたことを申し立てる。
VIII-5-1	開示の種類	刊行物
(i) VIII-5-1	開示の日付:	2002年02月22日(22. 02. 2002)
(ii) VIII-5-1	開示の名称:	日本農薬学会第27回大会講演要旨集P120
(iii) VIII-5-1	開示の場所:	
(iv) VIII-5-1	ナカナイル 歩の投令団のため	ナペアの投立団
(v)	本申立ては、次の指定国のため になされたものである。:	すべての指定国



Internation application No.
PCT/JP03/01917

A .	CLASSI	FICA	TION OF	SUBJEC	T MATTE	R				
	Int.	217	C12N1	5/29,	C12N9	/88, CI	L2N15	/60	, C12N5/14, A01H5/	UU
				tent Clas	sification (IPC) or to b	oth natio	onal c	elassification and IPC	
B.	FIELDS	SEA	RCHED	1 161	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		d b		ification numbols)	
Min	imum do Int.(cume	ntation sea C12N1	rched (cl. 5/29,	c12N9	/88, C	owed by 12N15	6/60	sification symbols) C12N5/14, A01H5/	00
					•					:
	Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched									
Doc	umentati	on se	arched othe	r than m	inimum do	cumentation	to the e	extent	that such documents are included	in the fields searched
Elec	tronic da	ata ba	se consulte	d during	the interna	tional search	n (name	of da	ta base and, where practicable, sea	rch terms used)
	Swis	sPro ank	ot/PIR, /EMBT./	/Gene	Seq, M GeneSe	edrine ((STN) SIS (D	W IAL	PI(DIALOG), OG)	
	00110		,	,			•			
C.	DOCUM	MENT	rs consii	DERED 7	O BE RE	LEVANT				
Cat	egory*		Citation o	f docume	ent, with in	dication, wh	nere app	ropria	ite, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Y		01/85		A2 (UN	IV LOU	ISIAN	IA S	STATE & AGRIC &	1-7
	İ		CH COL		2001	(15.11.	01).			
			EP 128					200	161358 A	
	Y	B∈	rnasco	ni P.	et a	l., A n	atura	all	y occurring point	1-7
	_	mu	itation	conf	fers b	road ra	nge 1	tole	erance to	
		h∈ J.	Biol.	les tr Chem.	nat ta: (1995	rget ac), Vol.	270,	No	ate synthase., .29,	
		рā	iges 17	'381 t	0 173	85				
	Y	Mo	ourad 0	. et	al.,	Intrage	nic :	rec	ombination in the	1-7
		CS	R1 loc	us of	f Arab	idopsis 94), Vo	.,			
			ges 17			94), VO	T • 2 4	J, 1	NO.2,	
		-	-							
×	Furth	er do	uments are	listed in	the contin	uation of Bo	x C.		See patent family annex.	
						hich is not	"T"	later document published after the in priority date and not in conflict with	the application but cited to	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing						"X"	understand the principle or theory un	derlying the invention cannot be		
"E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is							considered novel or cannot be considered when the document is taken alor	lered to involve an inventive		
cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)					r citation or o	"Y"	document of particular relevance; the considered to involve an inventive st	e claimed invention cannot be ep when the document is		
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means					xhibition or o		combined with one or more other suc combination being obvious to a person	ch documents, such		
"P" document published prior to the international filing date but later "&" than the priority date claimed						ling date but	"&"	document member of the same paten	t family	
Date of the actual completion of the international search D					al search	Date	of mailing of the international sea 25 March, 2003 (25	arch report		
12 March, 2003 (12.03.03))		25 March, 2005 (25	,	
Name and mailing address of the ISA/						Auth	orized officer			
Japanese Patent Office										
Faccimile No.							Tele	phone No.		



<u> </u>	City of the relevant nassages	Relevant to claim No.
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	1-7
Y	David CHIPMAN et al., Biosynthesis of 2-aceto-2-hydroxy acids: acetolactate synthases and acetohydroxyacid synthases., Biochim.Biophys.Acta (1998), Vol.1385, pages 401 to 419	1-7
Y	Chong CK. et al., Role of tryptophanyl residues in tobacco acetolactate synthase., Biochem.Biophys.Res.Commun. (1999), Vol.259, No.1, pages 136 to 140	1-7
Y	Chong CK. et al., Amino acid residues conferring herbicide tolerance in tobacco acetolactate synthase., Biochem.Biophys.Res.Commun. (2000), Vol.279, No.2, pages 462 to 467	1–7
Y	Kathleen Y. LEE et al., The molecular basis of sulfonylurea herbicide resistance in tobacco., The EMBO J. (1988), Vol.7, No.5, pages 1241 to 1248	1-7
A	WO 02/44385 A1 (Kumiai Chemical Industry Co., Ltd.), 06 June, 2002 (06.06.02), & AU 200214303 A	1-7



国際出願番号 PCT/JP03/01917

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. 7 C12N15/29, C12N9/88, C12N15/60, C12N5/14, A01H5/00						
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC)) Int. Cl. C12N15/29, C12N9/88, C12N15/60, C12N5/14, A01H5/00						
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの						
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS (DIALOG)						
C. 関連すると認められる文献 引用文献の カテゴリー* V WO 01/85970 A2(UNIV LOUISIANA STATE & & EP 1280928 A2 & AU 200161358 A Y Bernasconi P, et. al., A naturally occur broad range tolerance to herbicides synthase., J. Biol. Chem. (1995) Vol. 270, No. 29, p.	AGRIC & MECH COLL) 2001.11.15 $1-7$ rring point mutation confers $1-7$ that target acetolactate					
 ✓ C欄の続きにも文献が列挙されている。 * 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 	□ パテントファミリーに関する別紙を参照。 の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献					
国際調査を完了した日 12.03.03 国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	国際調金報告の発送日 25.03.03 特許庁審査官(権限のある職員) 4N 9839 参木 美葉子 年 日 101 内線 3488					



国際出願番号 PCT/JP03/01917

C(続き).	関連すると認められる文献	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Mourad G, et. al., Intragenic recombination in the CSR1 locus of	1-7
	Arabidopsis.,	
	Mol. Gen. Genet. (1994), Vol. 243, No. 2, p. 178-184	
· Y	David CHIPMAN, et. al., Biosynthesis of 2-aceto-2-hydroxy acids:	1-7
_	acetolactate synthases and acetohydroxyacid synthases.,	
	Biochim. Biophys. Acta(1998), Vol. 1385, p. 401-419	
Y ·	Chong CK, et.al., Role of tryptophanyl residues in tobacco	1-7
_	acetolactate synthase.,	
	Biochem Biophys Res Commun. (1999), Vol. 259, No. 1, p. 136-140	
Y	Chong CK, et. al., Amino acid residues conferring herbicide tolerance	1-7
	in tobacco acetolactate synthase.,	
	Biochem Biophys Res Commun. (2000), Vol. 279, No. 2, p. 462-467	
Y	Kathleen Y.LEE, et. al., The molecular basis of sulfonylurea herbicide r	1-7
_	esistance in tabacco.,	
	The EMBO J. (1988), Vol. 7, No. 5, p. 1241-1248	
Α	 WO 02/44385 A1(クミアイ化学工業株式会社)2002.06.06	1-7.
	& AU 200214303 A	